تدريبات عملية
فى
الميكروبيولوجيا العامة

دكتور
حسين عبد الله محمد الفضالى
أستاذ ورئيس قسم الميكروبيولوجيا
كلية الزراعة بدمياط - جامعة المنصورة

الطبعة الأولى
٢٠٠٨

تدريبات عملية
فى
الميكروبيولوجيا العامة

دكتور
حسين عبد الله محمد الفضالى
أستاذ ورئيس قسم الميكروبيولوجيا
كلية الزراعة بدمياط – جامعة المنصورة

الطبعة الأولى
٢٠٠٨

عنوان الكتاب : تدريبات عملية فى الميكروبيولوجيا العامة
المؤلف : أ.د/ حسين عبد الله محمد الفضالى
الناشر : مكتبة نانسي – دمياط
سنة النشر : ٢٠٠٨ م
رقم الطبعة : الأولى
رقم الإيداع : ١٥٦٦٣ / ٢٠٠٨ – 2008/15663
الترقيم الدولي : ٧ – ٨٠ – ٦١٨٦ - ٩٧٧
I.S.B.N 9777 – 6186 – 80 - 7

الموضوع	رقم الصفحة

الدرس العملى الثامن والعشرون

الدرس العملى التاسع والعشرون

الملاحق

المقدمة

لقد تطور دور الميكروبات فى حياة الإنسان تطوراً عظيماً حيث أخذ العالم الحديث بكل الوسائل الممكنة والتكنولوجيا الحديثة للاستفادة من دور هذه الميكروبات فى مختلف نواحى الحياه فاستغلها فى الكثير من جوانب حياته كالصناعات الغذائية واللبنية والتخمرات الصناعية التى تؤدى إلى إنتاج مواد ذات قيمه اقتصادية فى حياته. كما استغلها أيضاً فى الزراعة للمحافظة على خصوبة التربة ورفع كفائتها الإنتاجية ، ولم يغفل دورها فى التخلص من المخلفات الزراعية التي تلوث الوسط المحيط به بحتويلها إلى مواد اقتصادية آمنة وصديقة للبيئة ، ولا تنسى دورها أيضاً فى العلاج الحيوي فى الكثير من البيئات الملوثة بالمواد السامة مثل المبيدات ومتخلفات الصناعات الغذائية الصناعات الأخرى.

وتهدف دراسة الميكروبيولوجيا العامة العملية إلى تمرين الطلاب على التدريبات العملية الأساسية المتعلقة بالتعرف على الميكروبات من حيث شكلها وتركيبها ، وكيفية الحصول عليها من أوساطها المختلفة فى صورة مزارع فردية ، وإمكانية تقدير أعدادها وإنمائها والمحافظة عليها من التلوث أو تدهور نشاطها ، بالإضافة إلى التعرف على مجالاتها التطبيقية المختلفة.

ولمواكبة ركب التطور فى مجال الميكروبيولويجا العامة العملية والإتجاه به نحو المجالات التطبيقية ليكون معيناً للطالب عند تخرجه على المشاركة في سوق العمل بكفاءة عالية ، كان من الضرورى تطويع محتويات هذا المقرر لتصبح قادرة على تنمية عدة مهارات لدى خريجى كلية الزراعة لتشمل :

- الإستخدام الجيد للميكروسكوبات خاصة الميكروسكوب المركب للتعرف على أشكال الميكروبات ونظام تجمعها .

- تحضير البيئات المغذية الميكروبية العامة والمتخصصة اللازمة لتنمية الأنواع المختلفة من الميكروبات وكذلك طرق تعقيمها والتى تختلف طبقاً لتركيبها.
- عزل الميكروبات المختلفة فى صورة مزارع فردية ، ووسائل حفظها لمدد مختلفة مع المحافظة عليها من التلوث .
- تحديد الأنواع والسلالات البكتيرية المختلفة من خلال الوسائل التعريفية المتعددة وخاصة طرق الصبغ المختلفة سواء البسيط منها أو المركب .
- تحضير البادئات المستخدمة فى الصناعات التخميرية المختلفة مثل بادئ الزبادى .
- التعرف على بعض الميكروبات الأخرى غير البكتيريا مثل بعض أنواع الخمائر والفطريات الهامة إقتصادياً والملازمة للأغذية المختلفة .
- التعرف على درجة نقاوة أو تلوث أو فساد بعض المواد مثل المياه والألبان ومنتجاتها واللحوم والأسماك والمخللات والمعلبات والسكر والدقيق وغير ذلك من الأغذية المختلفة علاوة على دراسة ميكروبيولوجيا الأراضى الزراعية .

مما سبق يمكن القول بأن خريج كلية الزراعة يمكن أن يكتسب مهارة إدارة معمل ميكروبيولوجيا الأغذية وميكروبيولوجيا الأراضى . كذلك يستطيع الحكم على صلاحية المياه للاستهلاك الآدمى من الناحية البكتريولوجية حتى يمكن إستخدامها فى التصنيع الغذائى بمختلف أنواعه .

وإنى إذ أتقدم بهذا الكتاب العملى لطلاب كلية الزراعة بدمياط - جامعة المنصورة وإلى المهتمين بهذا المجال من الدراسة لم أنسى أن أزوده بمجموعة من المراجع الحديثة لتكون معيناً للقارئ على الفهم والتزود بالحديث من المعلومات ، كما أرجوا أن أكون قد عالجت التدريبات العملية الهامة التى يشملها هذا الكتاب فى صورة جيدة وبأسلوب مبسط يمكن الطالب أو القائم بها من أن يستفيد منه إستفادة حقيقية.

والله ولى التوفيق

المؤلف

إرشادات معملية

يجب أن تراعى عند دخولك المعمل وطوال فترة تواجدك فيه الإرشادات التالية لتتجنب الأخطار التى قد تحدث لك نتيجة إهمالك لواحد أو أكثر من هذه الإرشادات وحتى تكتمل إستفادتك من الدرس العملى.

١- حافظ على مظهرك عند دخولك المعمل فلا تدخل إلا مرتديا معطفك الأبيض وبحوزتك جميع الأدوات المطلوبة للعمل بجانب مذكرة الدروس العملية.

٢- تجنب العبث بأى من الأدوات المعملية أو المزارع الميكروبية أو الكيماويات الموجودة أمامك وإتبع فى إستعمالها إرشادات القائم بالتدريس.

٣- لا تترك المزارع الميكروبية بدون غطاء حتى لا تتلوث أو يتسبب تركها بدون غطاء فى حدوث أضراراً لك ولزملائك خاصة فى حالة مزارع الميكروبات الممرضة . كذلك عليك مراعاة شروط التعقيم طوال فترة تعاملك مع المزارع الميكروبية خاصة المرضية منها حتى لا تؤذي نفسك أو زملائك .

٤- إحتفظ بمكانك فى المعمل خالى من المواد غير الضروية وفى نهاية الدرس العملي إترك المكان خالياً تماماً من كل المواد والأدوات.

٥- حافظ على نظافة مكانك دائماً خاصاً فى نهاية الدرس العملى ليكون جاهزاً لإستقبال زميلك .

٦- كن دائم التركيز ومتجاوباً دائما مع القائم بالتدريس حتى تكتمل إستفادتك.

٧- لا تترك معملك إلا بعد أن تستوعب دروسك وتدريباتك العمليـــة تمامـــاً ويمكنك مراجعة القائم بالتدريس طوال الفترة المعملية أو الإستفسار منه عن كل ما تحتاجه .

٨- فى نهاية الدرس العملى نظف الميكروسكوب وإفصـــله عـــن مصـــدر الكهرباء وضعه فى مكان أمين للحفاظ عليه من التلف

٩- دون ملاحظاتك ورسوماتك التوضيحية الخاصة بكل درس .

١٠- إحتفظ بعلبة الشرائح الخاصة بك وبما تحتويه من شرائح مجهزة وذلك لتقديمها فى نهاية الفصل الدراسى حيث يتم تقييم نشاطك العملـــى مـــن خلالها.

الدرس العملى الأول

الأدوات المستخدمة فى معامل الميكروبيولوجيا

Tools Used in Microbiological Laboratories

يهدف هذا الدرس إلى تعرف كل من هو مهتم بدراسة الميكروبيولوجيا العامة على العديد من الأدوات المطلوب إستخدامها فى معامل الميكروبيولوجيا العامة ووظيفة كل منها حتى يسهل عليه معرفتها وكيفية استخدامها وكذلك متابعة الدروس التالية بعد ذلك .

يوجد العديد من الأدوات التى يجب توافرها فى معمل الميكروبيولوحيا ولا يمكن للدارس الإستغناء عنها حيث أنها تساعده فى إجراء التجارب والتدريبات المعملية ومن بين هذه الأدوات ما يلى :

١- موقد بنزن : ويستخدم للتسخين ولخلق جو معقم أثناء التلقيح ولتعقيم بعض الأدوات المستخدمة فى نقل اللقاح الميكروبى مثل إبرة التلقيح.

٢- إبرة التلقيح : وتستخدم فى نقل اللقاح الميكروبى إلى البيئات المغذية عند الرغبة فى الحصول على مزارع جديدة سواء سائلة أو صلبة .

٣- أطباق بترى : وتستخدم فى تنمية البكتريا والميكروبات الأخرى فى صورة مزارع مسطحة وتسمى مزارع الأطباق ويجب تعقيمها قبل إستخدامها ويوجد منها أطباق مصنوعة من البلاستيك سابقة التعقيم تستخدم لمرة واحدة Disposal وهى شائعة الإستخدام ولكنها غير إقتصادية خاصة تحت الظروف المحلية .

٤- أنابيب الإختبار : وهى ذات أحجام مختلفة وتستخدم فى أغراض متعددة بالمعمل.

٥- الماصات : وهى متعددة الأنواع والأحجام وتستخدم فى نقل السوائل والأوساط البيئية السائلة بمقادير محددة ، وتستخدم كذلك فى نقل اللقاحات الميكروبية السائلة لعمل مزارع جديدة.

٦- السحاحات : وتستخدم فى معايرة السوائل الحامضية أو القلوية المستخدمة فى التقديرات الكيماوية وكذلك ضبط درجة حموضة الأوساط البيئية الميكروبية.

٧- زجاجات العينات : وتستخدم فى حفظ السوائل والصبغات وفى عمل التخفيفات الميكروبية المتدرجة عند الرغبة فى تقدير أعداد الميكروبات ويفضل أن تكون ذات ألوان قاتمة مثل البنى.

٨- الشرائح الزجاجية : وهى متعددة الأنواع منها الأنواع العادية المستخدمة فى تجهيز الأغشية البكتيرية والتحضيرات الميكروبية المختلفة تمهيداً لفحصها ميكروسكوبياً والتعرف عليها، ومنها الشرائح ذات الفجوة والتى تستخدم فى عمل إختبار النقطة العالقة لدراسة حركة البكتريا والخمائر، وكذلك الشريحة الميكرومترية التى تستخدم فى معايرة العدسة الميكرومترية ولتقدير قطر المجال الميكروسكوبى عند الرغبة فى قياس حجم البكتريا وخلية الخميرة وكذلك قياس حجم جراثيم الفطر.

٩- أغطية الشرائح : وتستخدم عند الرغبة فى فحص التحضيرات الفطرية أو القطاعات النباتية ، وكذلك فى حالة إختبار النقطة العالقة لدراسة حركة خلايا البكتيريا والخمائر.

١٠- الدوارق المخروطية : وهى مختلفة الأحجام ومتعددة الأغراض فى المعامل الميكروبيولوجية عامة .

١١- الدوارق المعيارية : وهى مختلفة الأحجام أيضاً وتستخدم فى تحضير المحاليل المنظمة وفى عمل المحاليل متدرجة التركيز بدقة وذلك لعمل المنحنيات القياسية وأغراض أخرى.

١٢- مخابير مدرجة : وتستخدم فى نقل السوائل المستخدمة بحجوم معينة ولكنها غير دقيقة.

١٣- حوامل الأنابيب : تستخدم فى نقل الأنابيب من مكان لآخر أو عند الرغبة فى إستخدام الأنابيب فى وضع قائم فى الحضان.

١٤- حوافظ الماصات : وهى عبارة عن إسطوانات معدنية توضع فيها الماصات بحالة جافة قبل تعقيمها وتحفظ فيها لحين إستخدامها.

١٥- حوافظ الأطباق : وهى عبارة عن إسطوانات معدنية ترص فيها أطباق بترى على حامل داخلى ويتم تعقيمها وهى داخل تلك الإسطوانات.

١٦- مشارط وملاقط : وتستخدم بحالة معقمة عند عمل القطاعات أو عند تفتيت عينات الأغذية الصلبة لعزل الملوثات الميكروبية فى مزارع فردية لسهولة دراستها .

١٧- ترمومترات : لرصد درجات الحرارة وذلك لضبطها عند الدرجات المطلوبة للحضان أو الحمام المائى.

١٨- قطن غير ماص : لزوم عمل سدادات الأنابيب والدوارق.

١٩- سدادات الفلين والكاوتشوك : لزوم قفل الدوارق والأنابيب .

٢٠- بالطو المعمل والفوط الصفراء وقفازات الأيدى : للمحافظة على الملابس نظيفة وعدم تعرضها للصبغات والمواد الحارقة ، وكذلك إستخدام الفوط الصفراء لتنظيف المكان بعد الإنتهاء من العمل، وإستخدام القفازات لحفظ الأيدى من مخاطر المحاليل الكيماوية والملوثات الأخرى .

٢١- حوض الصبغ : يستخدم فى صبغ الأغشية البكتيرية المثبتة على الشرائح الزجاجية .

٢٢- فرش وأدوات تنظيف للأدوات والزجاجيات والبنشات وأرضية المعمل.

٢٣- منظفات سائلة وصلبة لتنظيف المعمل والأدوات المختلفة .

تدريب رقم (١) : فحص الأدوات المتوفرة فى معامل الميكروبيولوجيا

يجرى هذا التدريب بغرض تعريف الطالب بالأدوات المتوفرة بمعمل الميكروبيولوجيا ووظيفة كل منها

خطوات التدريب:

١- أمامك مجموعة من الأدوات المستخدمة فى معمل الميكروبيولوجيا حاول التعرف عليها وارسمها فى كراستك العملية .

٢- أذكر وظيفة كل أداة من الأدوات المعروضة أمامك.

٣- راجع ذلك مع القائم بالتدريس للتأكد من صحة ما كتبت.

أسئلة :

١- أذكر الوظيفة الخاصة بكل من الأدوات الآتية والتى يمكن تواجدها ى معمل الميكروبيولوجيا :

الشريحة المجوفة - طبق بترى - إبرة التلقيح - زجاجات العينات- العدسة الميكرومترية.

٢- ما مدى صحة العبارة الآتية :

تستخدم الشريحة الميكرومترية فى قياس حجم البكتريا.

الدرس العملى الثانى

الأجهزة المستخدمة فى معامل الميكروبيولوجيا

Instruments Used in Microbiological Laboratories

يستهدف هذا الدرس تعريف الدارس بالعديد من الأجهزة التى من الضرورى تواجدها وإستخدامها فى معامل ميكروبيولوجيا ، مع التركيز على الأنواع المختلفة من الميكروسكوبات ، وتنمية مهارته فى إستخدام الميكروسكوب الضوئي (المركب) لفحص التحضيرات الميكروبيولوجية المختلفة بهدف التعرف على أشكال البكتريا والميكروبات الأخرى التى تكون ملوثة للأوساط المختلفة ، وكذلك نظام تجمعها وأشكالها وكذلك جراثيمها ومكان وجود الجرثومة داخل الخلية البكتيرية .

هذا ويوجد العديد من الأجهزة التى يجب أن يزود بها معمل الميكروبيولوجيا ليتمكن الدارس من إجراء تدريباته العملية بيسر .
وفيما يلى بيان واضح بأهم هذه الأجهزة مع بيان وظيفة كل منها:

١- الميكروسكوب الضوئي (المركب) : هو الأداة الأساسية المستخدمة فى دراسة الكائنات الحية الدقيقة عامة من الناحية الوصفية وذلك لقدرته الفائقة على تكبير الأشياء.

٢- جهاز أرنولد : ويستخدم للتعقيم بالبخار تحت الضغط الجوي العادى على درجة حرارة ١٠٠°م ولمدة ٣ أيام متتالية ويسمى المعقم بالبخار المنساب ويسمى أيضاً بالحلة البخارية .

٣- جهاز الأوتوكلاف : ويستخدم للتعقيم بالبخار تحت الضغط الجوي المرتفع على درجة حرارة ١٢١°م ولمدة ٢٠ دقيقة .

٤- الحمام المائي : ويستخدم لتسخين وغلى السوائل عند الحاجة ، وكوسيلة تعقيم للتخلص من البكتريا غير المتجرثمة وذلك بالغليان لمدة ١٥ دقيقة وذلك لعينات الأغذية السائلة أو العصائر أو المحاليل الأخرى كمستخلص التربة .

٥- الفرن : ويستخدم فى تعقيم الأدوات والأوانى الزجاجية المطلوبة بحالة جافة ومعقمة ويسمى بالمعقم بالهواء الساخن .

٦- المرشحات البكتيرية : وتستخدم فى تعقيم السوائل التى تتحلل أو تفسد بالحرارة العالية ويوجد منها عدة أنواع وتحتاج لإحتياطات خاصة عند الإستعمال.

٧- الحضان : ويستخدم لتوفير درجات الحرارة اللازمة لتنمية الميكروبات وحفظها على درجة الحرارة المناسبة لنموها ونشاطها.

٨- الحضان الرجاج (الهزاز) : ويستخدم لتنمية المزارع السائلة.

٩- جهاز ماكنتوش وفيلدس : ويستخدم لتنمية البكتريا اللاهوائية.

١٠- المجفف : ويستخدم فى حفظ العينات فى حالة جافة ويمكن تعديله ليستخدم فى تنمية البكتريا اللاهوائية.

١١- جهاز قياس درجة الحموضة : ويستخدم لقياس درجة الحموضة والقلوية للأوساط المختلفة pH-meter .

١٢- جهاز سبكتروفوتومتر : ويستخدم لقياس العكارة الناتجة عن النمو البكتيرى فى المزارع السائلة وكذلك الكثافة اللونية للسوائل الملونة المختلفة.

١٣- جهاز الطرد المركزي : ويستخدم فى فصل الكتلة الخلوية الميكروبية من المزارع السائلة ، وهناك أجهزة الطرد المركزى تحت التبريد والتى تستخدم عند الرغبة فى ترسيب الإنزيمات والبروتينات والجزيئات الأخرى.

١٤- جهاز التجفيد : ويستخدم فى تجهيز المزارع البكتيرية المطلوب حفظها بحالة جافة لمدة طويلة وذلك بنزع الماء منها عن طريق تعريضها للتجفيف تحت التجميد حتى لا تتأثر بالحرارة العالية.

١٥- جهاز التقطير : ويستخدم للحصول على الماء المقطر المطلوب إستخدامه فى التجارب العملية وتحضير المحاليل الكيماوية القياسية .

١٦- لمبة الأشعة فوق البنفسجية : وتستخدم لتعقيم معمل ميكروبيولوجيا وغرف التلقيح الميكروبي وتستخدم كذلك فى تعقيم المسطحات المختلفة داخل المعمل .

١٧- غرفة التلقيح : غرفة ذات وسط معقم باستخدام تيار الهواء المعقم حيث تستخدم فى نقل اللقاحات عند تجهيز المزارع الميكروبية تحت ظروف معقمة وكذلك تستخدم لإجراء أى عملية تتطلب شروط تعقيم.

١٨- مقلب مغناطيسي : جهاز كهربائى يستخدم لسرعة إذابة المركبات صعبة الذوبان فى الماء عن طريق التقليب المغناطيسى وقد يتم على درجات حرارة مختلفة حسب طبيعة المركب أو المادة المراد إذابتها.

١٩- مقلب الأنابيب : جهاز كهربائى يستخدم لرج أنابيب الإختبار لإذابة المواد أو لتوزيع النمو الميكروبى فى الوسط السائل .

أسئلة :

١- أذكر وظيفة كل من : جهاز أرنولد – جهاز الأتوكلاف

٢- فيم يستخدم كل من الحمام المائى – الحضان الرجاج

٣- ما هو دور كل من الآتى فى معمل الميكروبيولوجيا :

مقلب الأنابيب - المقلب المغناطيسى - غرفة التلقيح - جهاز الطرد المركزى - جهاز ماكنتوش وفيلدس .

الدرس العملى الثالث

الميكروسكوب

The Microscope

أنواع الميكروسكوبات :

نظرا لدقة و صغر حجم الميكروبات لذا كان لابد من استخدام أجهزة تكبير دقيقة تستخدم في تمييز هذه الميكروبات والتعرف على أشكالها و كذلك أجزائها التى لا يمكن توضيحها بالعين المجردة . ومن أهم هذه الأجهزة هو الميكروسكوب الضوئي المركب Light or compound microscope والميكروسكوب ذو الحقل المظلم Dark field microscope والميكروسكوب متباين الأطوار Phase contrast microscope وكذلك الميكروسكوب الإلكتروني Electron microscope . وغالبا ما يستخدم الميكروسكوب الضوئي العادى في فحص الخلايا البكتيرية للتعرف على أشكالها ونظام تجمعها وشكل جراثيمها وموقعها داخل الخلية وأحجامها مع ضرورة استخدام الصبغات لزيادة التباين بينها وبين الوسط المحيط بها ولزيادة وضوح الرؤية. أما الميكروسكوب ذو الحقل المظلم فهو يستخدم لزيادة التباين بين الغشاء المحضر و الوسط المحيط به دون إستخدام صبغات وذلك للسماح بدراسة الخلايا الحية , بينما الميكروسكوب متباين الأطوار فإنه يمكن أن يستخدم في فحص الخلايا الحية و تركيبها الداخلى بدون صبغ أيضا. ونظرا لقدرة الميكروسكوب الإلكتروني الفائقة على التكبير إذ تبلغ ألف مرة قدر الميكروسكوب الضوئي فإنه يستخدم في فحص الجزيئات

المتناهية فى الصغر خاصة الفيروسات النباتية والحيوانية . ونظراً لكون الميكروسكوب الضوئي (المركب) هو الأكثر استعمالا في معامل ميكروبيولوجيا فسوف نتناوله بالتفصيل من النواحى التالية:

أولا: تركيب الميكروسكوب

يتركب الميكروسكوب المركب من مجموعتين من الأجزاء هي مجموعة الأجزاء الآلية و مجموعة الأجزاء البصرية.

أ- الأجزاء الآلية The mechanical parts

وهي مجموعة من الأجزاء التي تسهل عمل وحركة مجموعة الأجزاء البصرية في الميكروسكوب و تشمل:

١- أنبوبة جسم الميكروسكوب Body tube

ويثبت في طرفها العلوي القطعة العينية و في طرفها السفلى القطعة الأنفية المتحركة.

٢- أنبوبة السحب المدرجة Graduated drow tube

وهي توجد بداخل الأنبوبة الأولى ويمكن سحبها للخارج والداخل مما يبعد أو يقرب المسافة بين العدسة الشيئية والقطعة العينية للتحكم فى مساحة الحقل الميكروسكوبي.

٣- القطعة الأنفية المتحركة Revolving nose piece

وهذه القطعة يمكن تحريكها حركة دائرية مما يسهل معه تغيير وضع العدسات الشيئية , وبها عادة ٣ فتحات و أحيانا ٤ فتحات لتثبيت العدسات الشيئية ذات القوة التكبيرية المختلفة .

٤- المسرح Stage

ويوضع عليه الأشياء المراد فحصها, و في حالة البكتريا توضع على المسرح الشريحة الزجاجية التي تحتوي على الغشاء البكتيرى المثبت

والمصبوغ ، ويوجد على المسرح مقابض Clips لتثبيت الشرائح . والمسرح قد يكون مربعاً أو دائرياً وقد يتحرك بواسطة محرك .

٥- الهيكل Stand

ويشمل عادة على الآتي :

القاعدة Base : وشكلها هلالي كحدوة الحصان وتستعمل لتثبيت الميكروسكوب عند وضعة فى مكان استعماله

المفصل Joint : ويستعمل لإمالة الميكروسكوب عند الحاجه وحسب راحة من هو قائم بالفحص.

الذراع Arm : و هو الجزء الذي يحمل أنبوبة الميكروسكوب والمسرح ويتصل بالقاعدة عن طريق المفصل ، ويستعمل الذراع أيضا فى حمل الميكروسكوب من مكان لأخر ويوجد عليه المعدل التقريبي Coarse adjustment والمعدل الدقيق Fine adjustment ويمكن بواسطتهما تحريك الأنبوبة إلى أعلى وإلى أسفل لتعديل المسافة بين المرئي والعدسة الشيئية حتى يتسنى رؤية المرئي في أوضح حالة ويستعمل المعدل التقريبي أولاً ثم يعقبه المعدل الدقيق لضبط البعد البؤري للعدسة الشيئية حيث يكون المرئى فى اوضح صورة.

ب- الأجزاء البصرية Optical parts

وتتركب من :

١- القطعة العينية Eye piece

وتتركب من أنبوبة معدنية قصيرة بها عدستين لكل منهما وجه محدب والآخر مسطح، العلوية سمى عدسة العين و السفلية تسمي العدسة المجمعة. ووظيفة القطعة العينية هي تكبير صورة المرئي الحقيقية الناتجة بواسطة العدسة الشيئية , و قد يزود الميكروسكوب بعدسة عينية ميكروميترية عند الرغبة في قياس حجم البكتريا.

٢- العدسات الشيئية Objective lenses

وهي أهم و أدق جزء في مجموعة الأجزاء البصرية و هي تثبت بالقطعة الأنفية المتحركة, و تتركب كل عدسة شيئية من عدستين أو ثلاث أو أربع عدسات مثبتة في إسطوانة نحاسية قابلة للتحرك حركة دائرية . ووظيفة الشيئية هي تكوين صورة حقيقية مقلوبة مكبرة للمرئي تتكون داخل أنبوبة جسم الميكروسكوب.

أنواع الشيئيات وإستخداماتها

يوجد بالميكروسكوب المستخدم في الأعمال الميكروبيولوجية عادة ثلاث أنواع من العدسات الشيئية هي الصغري والكبري والعدسة الزيتية المنغمسة ، وتستعمل العدستان الأولى والثانية بحالة جافة أما العدسة الثالثة فعند استخدامها في الفحص فإنه يوضع بينها وبين الشريحة تحت الدراسة نقطة من زيت السيدر فتنغمس فيه ومن هنا جاءت تسميتها بالعدسة الزيتية المنغمسةOil immersion lens . ولكل عدسة من العدسات الثلاث استعمال خاص كما أنها تختلف في قوة تكبيرها حيث تستخدم العدسة الشيئية الصغري في فحص التجمعات والمستعمرات البكتيرية وهيفات الفطر وقوة تكبيرها تعادل 10 x أى أنها تكبير عشر مرات .

بينما تستخدم العدسة الشيئية الكبري في فحص التحضيرات البكتيرية المبتلة كالنقطة المعلقة لدراسة حركة البكتيريا والخمائر ، وتتراوح قوة تكبيرها بين 45 x - 40 . أما العدسة الزيتية المنغمسة تستخدم في فحص التحضيرات البكتيرية الجافة كالأغشية البكتيرية المصبوغة ، وتتراوح قوة تكبيرها بين 100 x - 95 .

٣- المكثف Condenser

وهو يوجد أسفل المسرح ويتركب من عدستين مثبتتين في طرفي أنبوبة نحاسية إسطوانة الشكل ، ووظيفته هي تجميع الأشعة الضوئية

المرسلة من المرآة لإضاءة المرئي و من ثم ترسل للشيئية , و بتحريك المكثف إلى أسفل و إلى أعلى بواسطة ضابط المكثف يمكن تنظيم كمية الضوء التي تنفذ إلى المرئي.

٤- المرآة Mirror

ولها وجهان أحدهما مسطح و الأخر مقعر و هي مثبتة أسفل المكثف، ويمكن تحريكها في أى إتجاه حسب الحاجة ووظيفتها هو أن تعكس الضوء من مصدره إلى الجسم المرئي مباشرة أو من خلال المكثف , وعند فحص الأغشية البكتيرية المصبوغة يستعمل الوجه المسطح من المرآة.

٥- الحجاب Diaphragm

وهو يوجد أسفل المكثف ويتركب من مجموعة صفائح رقيقة ويمكن فتحه أو غلقه للتحكم في كمية الأشعة التي تنعكس من المرآة إلى المكثف وبذلك يمكن التحكم في درجة الإضاءة.

٦- المنشور Prism

قد توجد في بعض أنواع الميكروسكوبات منشورات زجاجية Prisms تتحكم في مسار الأشعة الضوئية داخل الميكروسكوب نحو العدسة العينية.

ثانيا: نظرية عمل الميكروسكوب

يتوقف فهم نظرية عمل الميكروسكوب على فهم طبيعة عمل العدسات المحدبة اللامة في عملية التكبير . فعند وضع جسم على بعد أقل من ضعف البعد البؤري للعدسة الشيئية اللامة وأكبر من بعدها البؤري تتكون للجسم صورة حقيقية مقلوبة مكبرة على بعد أكبر من ضعف بعدها البؤرى . وفي حالة ما تكون هذه الصورة على بعد أقل من البعد البؤري للعدسة العينية اللامة تتكون صورة مكبرة ومعتدلة بالنسبة للصورة الحقيقية ومقلوبة بالنسبة للجسم الأصلى (المرئي) , ومن ذلك يتضح أن:

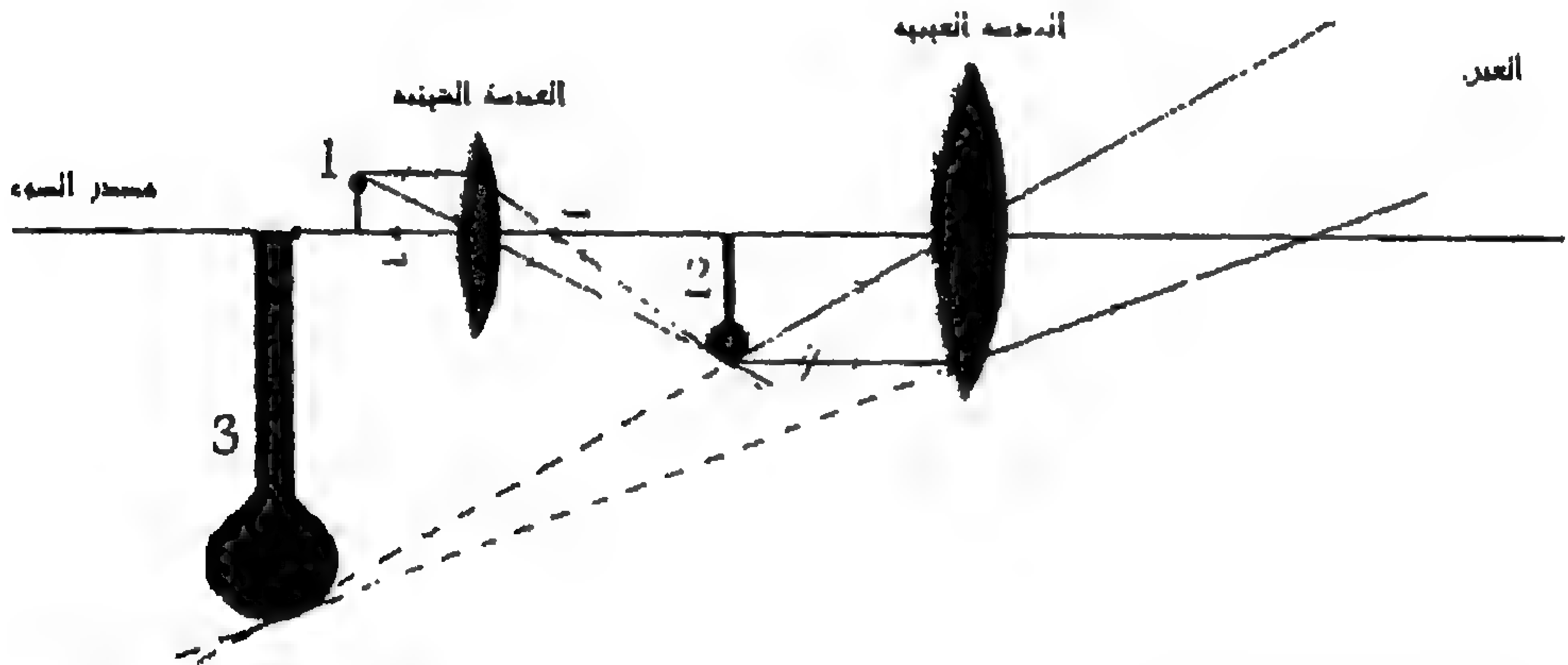
أ- عمل الشيئية

إستقبال الأشعة الضوئية الساقطة عليها من الجسم المرئـــي المـــراد فحصه وتكوين صورة حقيقية مقلوبة مكبرة على بعد أقل من البعد البـــؤرى للعينية.

ب- عمل العينية

إستقبال صورة الجسم الحقيقية المقلوبة على بعد أقـــل مـــن بعـــدها البؤري و تكوين صورة تقديرية مكبرة و معتدلة بالنسبة للصورة الحقيقيـــة المتكونة بالشيئية و مقلوبة بالنسبة للجسم الأصلى وهى الصورة النهائية كما هو واضح شكل رقم ١ .

ومما سبق يتضح أن قوة التكبير الكلية للميكروسكوب = قوة تكبير الشيئية × قوة تكبير العينية.



1 الجسم المراد فحصه
2 صورة حقيقية مقلوبة مكبرة
3 صورة تقديرية مقلوبة مكبرة بالنسبة للجسم الأصـــلى ومعتدلـــة بالنســـبة للصورة الأولى

شكل ١ : رسم تخطيطى يوضح نظرية عمل الميكروسكوب فى تكبير الأشياء

ثالثاً : نظرية عمل زيت السيدر فى الفحص الميكروسكوبى

العدسة الزيتية المنغمسة هى إحدى الشيئيات القوية التى تهيئ أكبر درجة تكبير يمكن الحصول عليه للأجسام المراد فحصه بواسطة الميكروسكوب الضوئى المركب . وهي تستخدم في فحص التحضيرات البكتيرية الجافة ، ويطلق عليها هذا الإسم لأنه يوضع بينها وبين التحضير المراد فحصه نقطة من زيت السيدر تنغمس فيها أثناء عملية الفحص . ويفضل إستعمال زيت السيدر عن غيره لأن معامل إنكساره يماثل معامل إنكسار الزجاج (١,٥). وإذا تعذر الحصول على زيت السيدر فيستعمل زيت البرافين بشرط أن يكون نقياً خالياً من الشوائب . والهدف الوحيد من إستعمال الزيت هو زيادة كمية الضوء التى تدخل للعدسة الزيتية من المكثف وليس التكبير فالزيت يعمل على تجميع الأشعة ويمنع إنكسارها عند خروجها من زجاج الشريحة إلى العدسة فتزداد كمية الإضاءة.

رابعاً : إحتياطات خاصة باستعمال الميكروسكوب

١- تأكد من نظافة الأجزاء البصرية قبل قيامك بعملية الفحص.

٢- عند الفحص الميكروسكوبى لا تستعمل إحدى العينين ولا تقفل الأخرى لأن ذلك يضعفها ولذلك يجب إستعمالهما معاً.

٣- لا ترفع العدسة العينية من مكانها إلا عند الضرورة كاستبدالها بالعدسة العينية الميكرومترية ، كما لا تستخرج الشيئية من مكانها حتى لا ينفذ الغبار داخل أنبوبة الميكروسكوب فيؤثر على مسار الضوء وبالتالى على الصورة المتكونة .

٤- لا تلمس سطح العدسات بأصابعك أثناء العمل حتى لا تعلوها سحابة تمنع ظهور الأجسام المراد فحصها بالدقة المطلوبة .

٥- عند تنظيف العدسات إستعمل قطعة تيل نظيفة غير وبرية مع الإستعانة بقليل من الزيلول لإزالة المواد الدهنية والزيت من عليهـا , ويراعـى إجراء هذه العملية كلما انتهيت من إستعمال الميكروسكوب في الفحص.

٦- لا تستعمل الكحول مطلقا في تنظيف العدسات إذ أنـه يـذيب المـادة اللاصقة للعدسات المركبة مما يسبب تلفها ، كما أن الإفراط في إستخدام الزيلول يؤدى إلى نفس النتيجة.

٧- عند نقل الميكروسكوب من مكان لآخر إحمله من الذراع باليد اليمنـى مع وضع اليد اليسرى أسفل القاعدة.

تدريب (٢) : دراسة الأجهزة المتوفرة بمعمل الميكروبيولوجيا

يجرى هذا التدريب بغرض تعريف الدارس بالأجهزة المتوفرة بمعمل الميكروبيولوجيا ووظيفة كل منها .

خطوات التدريب :

١- أمامك مجموعة من الأجهزة المستخدمة في معامل الميكروبيولوجيـا حاول التعرف عليها و ارسمها.

٢- أذكر وظيفة كل جهاز من الأجهزة المعروضة أمامك.

٣- راجع ذلك مع القائم بالتدريس للتأكد من صحة ما كتبت.

تدريب (٣) : إستخدام الميكروسكوب المركب في فحص التحضيرات البكتيرية الجافة

يجرى هذا التدريب بغرض تنمية مهارة الـدارس علـى إسـتخدام العدسة الزيتية المنغمسة في فحص الأغشية البكتيرية المصبوغة (الأغشـية المصبوغة) .

خطوات التدريب:

١- نظف الميكروسكوب جيدا و خاصة الأجزاء البصرية منه.

٢- إضبط أنبوبة السحب المدرجة على التدريج الصحيح حتى تعطي دقة في فحص الصورة حيث أن قوة تمييز العدسة تتوقف على طول أنبوبة الميكروسكوب.

٣- إرفع المكثف إلى أعلى نقطة , وإفتح الحجاب الضوئي .

٤- إجعل الشيئية الصغرى على إستقامة أنبوبة الميكروسكوب.

٥- أنظر خلال القطعة العينية وحرك المرآة في مواجهة المصدر الضوئي للحصول على حقل فحص مضيئ تماما.

٦- ضع الشريحة ذات التحضير البكتيري الجاف على المسرح بعد وضع نقطة من زيت السيدر عليه ثم إستبدل العدسة الصغرى بالعدسة الزيتية المنغمسة بحيث تصبح على إستقامة أنبوبة الميكروسكوب وذلك بسماع الصوت المعتاد .

٧- إجعل نظرك في مستوى المسرح و أخفض العدسة الزيتية بواسطة الضابط التقريبي حتى تنغمس مقدمتها في زيت السيدر وإستمر في خفضها حتى تتلاقى مقدمتها مع التحضير برفق.

٨- أنظر خلال القطعة العينية وإرفع الزيتية إلى أعلى تدريجيا بواسطة المعدل التقريبي حتى ظهور لون الصبغة فاستعمل المعدل الدقيق حتى تمام وضوح صورة المرئى المراد فحصه.

تدريب (٤) : فحص الأشكال المختلفة للبكتيريا باستخدام العدسة الزيتية المنغمسة

يجرى هذا التدريب بغرض تنمية مهارة الدارس في التعرف على الأشكال المختلفة من البكتريا و نظم تجمعها كإحدى الخطوات الهامة عند

تعريف الأجناس والأنواع والسلالات المختلفة من البكتريا شائعة التواجد فى الأوساط المختلفة ، كما يكسب الدارس مهـارة اسـتخدام العدسـة الزيتيـة المنغمسة بصفة مستمرة مع المحافظة عليها .

خطوات التدريب :

١- أمامك مجموعة من الشرائح المحتوية على أغشية بكتيرية مصبوغة,تـم عزلها من مصادر مختلفة . إفحصـها ميكروسـكوبياً طبقـاً للخطـوات المذكورة فى التدريب السابق وتعرف على أشكالها و نظم تجمعها .

٢- إرسم حقولاً ميكروسكوبية تمثل النماذج السابقة موضحاً بهـا الأشـكال ونظم التجمع المختلفة.

٣- اعرض ما تحصلت عليه من رسوم توضح الاشكال المختلفـة لخلايـا البكتيريا على القائم بالتدريس لتأكيد صحة الفحص.

اسئلة :

١- ضع علامة √ أو X أمام العبارات الآتية :

أ- تتناسب قوة التكبير الكلية للميكروسكوب تناسبا طردياً مع تكبير العينيـة وعكسياً مع تكبير الشيئية.

ب- يستخدم الميكروسكوب متباين الأطوار فى فحص الخلايا البكتيرية الحية بدون صبغ نظراً لوجود تباين واضح بين الخلية والوسط المحيط.

جـ- تستخدم العدسة الزيتية المنغمسة فى فحص التحضـيرات البكتيريـة المبتلة لدراسة حركة البكتريا والخمائر

د- تصبغ الأغشية البكتيرية عند فحصها لتقليل التباين بين الخلايا والوسـط المحيط بها حتى تسهل الرؤية

هـ- تستخدم الشيئية الصغرى فى فحص الأغشـية البكتيريـة المصـبوغة وهيفات الفطر

و- تعمل العدسة الشيئية على تكوين صورة حقيقية مقلوبة مصغرة للشيء عند وضعه على بعد أكبر قليلاً من بعدها البؤرى وأقل من ضعف البعد البؤري.

ز- يستخدم جهاز أرنولد فى التعقيم على درجة الغليان تحت الضغط الجوى العادى ولذلك يسمى المعقم بالبخار المنساب

٢- أذكر فقط إستعمالات العدسات الشيئية الثلاث .

٣- ما هى أنواع الميكروسكوبات التى يمكن أن تجدها فى معمل الميكروبيولوجيا .

٤- علل :

أ- ضرورة إستعمال زيت السيدر عند الفحص بالعدسة الزيتية المنغمسة.

ب- يفضل إستعمال الزيلول بدلاً من الكحول فى تنظيف العدسات .

جـ- لا يمكن فحص البكتريا والتعرف على أشكالها بالميكروسكوب العادى بدون صبغ .

الدرس العملى الرابع

التعقيم

Sterilization

يستهدف هذا الدرس تعريف الدارس بالأدوات والأجهزة المستخدمة فى عملية التعقيم ، وتعريفه بكل طريقة من الطرق المستخدمة فى تعقيم المواد والأدوات المطلوبة بحالة خالية من التلوث الميكروبي فى معامل الميكروبيولوجيا العامة . وكذلك تنمية مهارة الدارس فى إستخدام وسائل التعقيم المختلفة حتى يكون مؤهلاً للعمل فى السوق الخارجى بكفاءة عالية خاصة فى مصانع الأغذية والألبان ومصانع تعليب الأغذية المختلفة وكذلك معامل ميكروبيولوجيا الأراضى والمياه والبيئة .

تعريف التعقيم :

هو عملية الغرض منها التخلص التام من جميع الكائنات الحية الدقيقة سواء كانت فى الحالة الخضرية أو المتجرثمة وجعل المواد والأدوات خالية منها تماما.

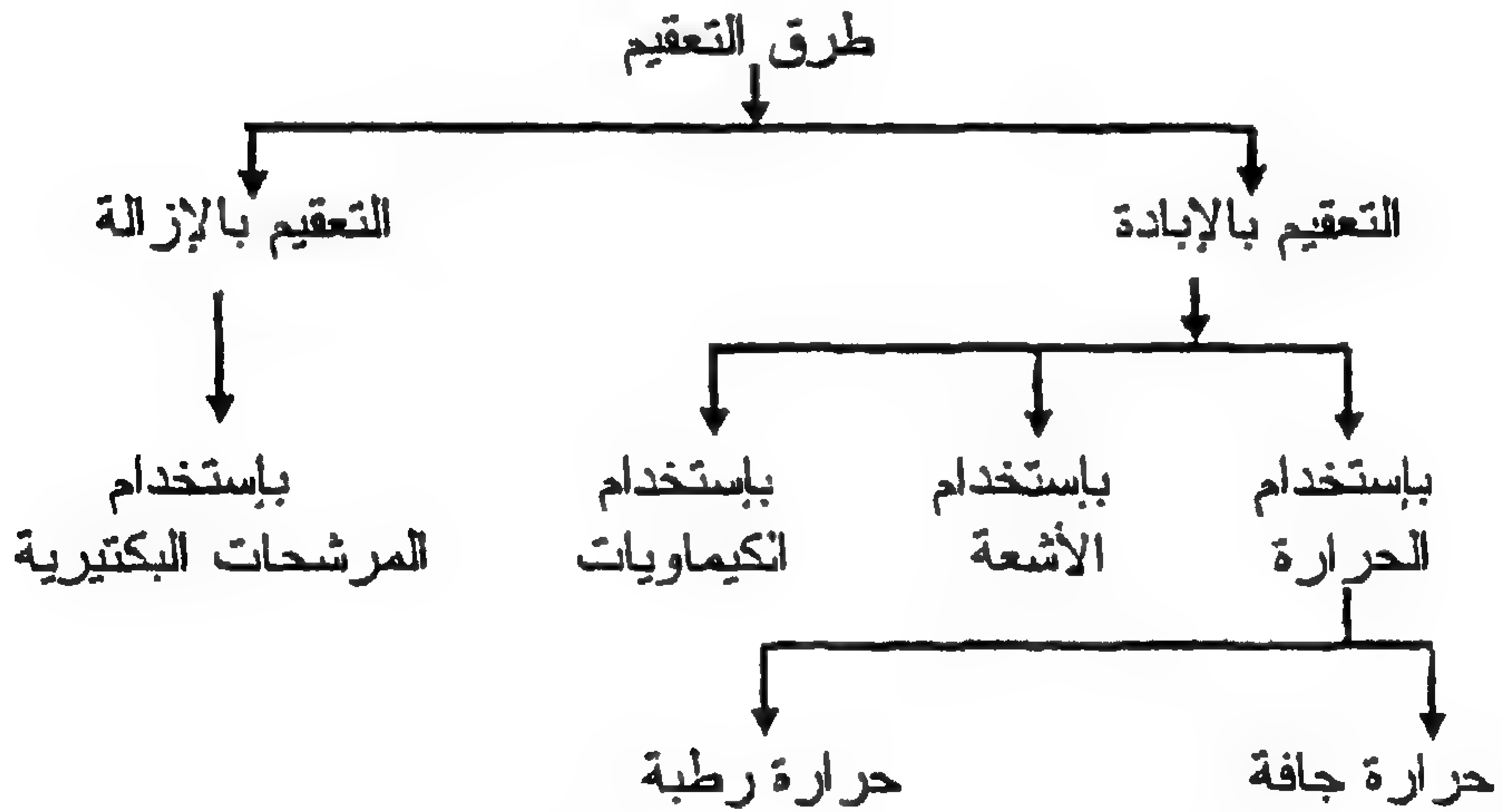
أهمية التعقيم :

للتعقيم أهمية كبيرة فى كثير من المجالات ففى العمليات البكتريولوجية يجب التخلص من جميع أطوار الكائنات الحية الدقيقة الملوثة للأدوات والمواد والأجهزة والبيئات المغذية خاصة عند الرغبة في عزل وتنقية البكتيريا فى معامل الميكروبيولوجيا الصناعية وميكروبيولوجيا الأغذية والألبان كذلك معامل ميكروبيولوجيا الأراضى والمياه والبيئة .

وفى الأغراض الطبية يستخدم التعقيم في تطهير جميع المواد و الأدوات الطبية المستعملة حتى لا تصبح مصدراً للعدوى , وكذلك حفظ الأدوية أثناء تحضيرها. وكذلك فى مجال حفظ الأغذية حيث يستخدم التعقيم فى قتل ما بها من ميكروبات للتخلص من عوامل الفساد والتسمم الغذائى .

طرق التعقيم :

تتعدد طرق التعقيم رغم أن الهدف منها واحد وهو التخلص نهائياً من جميع الكائنات الحية ، ذلك لتتفق كل طريقة مع طبيعة المادة المراد تعقيمها, وعموما يمكن تلخيص طرق التعقيم المعتادة حسب المخطط التالى:



حرارة جافة	حرارة رطبة
١- التسخين لدرجة الإحمرار	١- الغلى فى حمام مائي
٢- التلهيب الكحولى	٢- التعقيم على درجة الحرارة المنخفضة
٣- التعقيم بالهواء الساخن	٣- التعقيم بالبخار تحت الضغط الجوى العادى
	٤- التعقيم بالبخار تحت الضغط الجوى المرتفع

هذا مع ملاحظة أن الحرارة الجافة تكون أقل كفاءة فى التعقيم من الحرارة الرطبة لأن الرطوبة تزيد من النشاط الحيوى للميكروب فيسهل التأثير عليه ، وكذلك تساعد الرطوبة على تخلل الحرارة لجسم الميكروب وتأثيرها على البروتوبلازم فتتلفه. ولذلك فإنه عند إستخدام الحرارة الجافة فى التعقيم يجب إستخدام درجة حرارة أعلى ومدة أطول عنه فى حالة إستخدام الحرارة الرطبة.

أولا: طرق التعقيم بالحرارة الجافة

١- التسخين لدرجة الإحمرار

وتستخدم هذه الطريقة فى تعقيم إبر التلقيح وأطراف الملاقط باستعمال لهب موقد بنزن مباشرة.

٢- التلهيب الكحولى

وتستخدم هذه الطريقة فى تعقيم المشارط وفوهات أنابيب المزارع والشرائح الزجاجية وأغطية الشرائح ويتم ذلك بإمرار المادة مبللة بالكحول خلال اللهب دون إحمرارها ، وبالنسبة للأدوات المعدنية مثل المشارط والمقصات فيمكن غمسها فى كحول ثم تعريضها للهب.

٣- التعقيم بالهواء الساخن

وتستخدم هذه الطريقة في تعقيم الأدوات الزجاجية المطلوبة بحالة جافة مثل أطباق بترى والماصات وأنابيب الإختبار والدوارق وزجاجات العينات وذلك بعد سدها بسدادات قطنية قبل التعقيم , وتعقم الأطباق والماصات بعد وضعها فى علب خاصة بها ، كما تستخدم في تعقيم الزيوت المعدنية التى تستخدم فى حفظ المزارع البكتيرية كزيت البرافين ، ويستخدم في هذه الطريقة جهاز المعقم بالهواء الساخن (الفرن) وهو عبارة عن صندوق معدنى له ثلاثة جدران بينهما فراغان لمرور الهواء الساخن

بالكهرباء والجهاز مزود بترمومتر لرصد درجات الحرارة . وهذه هي درجات الحرارة المستعملة والمدة اللازمة لتمام التعقيم :

١- التعقيم على درجة ١٨٠°م لمدة ½ ساعة لتعقيم الأدوات الزجاجية غير المغطاة بسدادات قطنية كأطباق بترى والماصات.

٢- التعقيم على درجة ١٦٠°م لمدة ساعة لتعقيم الأدوات الزجاجية ذات السدادات القطنية حتى لا يحترق القطن .

٣- التعقيم على درجة ١٤٠°م لمدة ٣ ساعات.

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند استخدام الفرن

أ- وضع الأدوات المطلوب تعقيمها قبل بدء عملية تسخين الجهاز بتوصيل التيار الكهربى.

ب- يجب أن تكون الأدوات المراد تعقيمها جافة تماماً عند وضعها في الجهاز .

ج- عدم تعبئة الجهاز فوق طاقته بالأدوات المراد تعقيمها.

د- توضع الأطباق والماصات في الإسطوانات الخاصة بها قبل التعقيم.

هـ- تحسب المدة اللازمة لتمام التعقيم إبتداءاً من وصول درجة الحرارة إلى الدرجة المطلوبة.

و- يراعى فصل التيار الكهربى بعد المدة اللازمة للتعقيم مع عدم فتح الجهاز إلا بعد تمام التبريد حتى لا يتسبب ذلك في كسر الأدوات الزجاجية بالتبريد المفاجئ.

ثانيا: طرق التعقيم بالحرارة الرطبة

١- الغلي في حمام مائي

حيث يكفي الغليان لمدة ١٥-٢٠ دقيقة لقتل الخلايا الخضرية للميكروبات بينما تظل الجراثيم حية . وكانت تستخدم هذه الطريقة قديماً فى تعقيم السرنجات والمقصات والمشارط وهى محدودة الإستعمال حيث تستخدم فقط فى تعقيم الأدوات الصغيرة والخفيفة خاصة في العيادات والوحدات الصحية .

٢- التعقيم بالبخار تحت الضغط الجوى العادي

ويستخدم فى ذلك جهاز أرنولد Arnold ويسمى الحلة البخارية أو المعقم بالبخار المنساب . الجهاز عبارة عن إناء إسطوانى ذو جدارين وهو مصنوع من النحاس وله غطاء به فتحة لخروج البخار وفى أسفله حنفية لتوصيل الماء ويعمل بالكهرباء ويوجد بداخله أرفف مثقبة توضع عليها الأدوات والأشياء المراد تعقيمها. ويتم التعقيم باستخدام جهاز أرنولد بطريقتين هما:

أ - التعقيم السريع

ويتم على درجة حرارة ١٠٠ °م لمدة ١,٥ ساعة ، وتستخدم هذه الطريقة لتعقيم البيئات الغذائية والمواد التى لا تتأثر خواصها الطبيعية أو الكيماوية عند تعريضها لدرجة حرارة ١٠٠ °م لمدة طويلة مثل بيئة الأجار المغذى أو المرق المغذى.

ب - التعقيم المتقطع

ويتم على ١٠٠ ° م لمدة ٢٠ دقيقة على مدى ثلاثة أيام متتالية على أن تكون الفترة بين المرة والأخرى ٢٤ ساعة. وتعتمد فكرة التعقيم المتقطع على

أنه فى اليوم الأول يتم التخلص من جميع الخلايا الخضرية بينما لا تتأثر الجراثيم ، نتيجة المعاملة في اليوم الأول تنمو الجراثيم وتتحول إلى خلايا خضرية حيث يتم القضاء عليها من المعاملة فى اليوم الثانى. أما المعاملة فى اليوم الثالث فتكون لتمام التخلص من الميكروبات المتبقية ولضمان عملية التعقيم. وتستخدم طريقة التعقيم المتقطع لتعقيم البيئات الغذائية والمواد التى تتغير خواصها الطبيعية والكيماوية بتعريضها لدرجة حرارة ١٠٠ ° م لمدة طويلة مثل بيئة الجيلاتين المغذي وبيئة لبن عباد الشمس وكذلك البيئات المحتوية على سكريات.

إحتياطات إستخدام جهاز أرنولد

أ- مراعاة وجود كمية كافية من الماء عند العلامة المحددة لذلك مع بداية التعقيم.

ب- يحسب زمن التعقيم بعد فترة من خروج البخار ولضمان غليان الماء.

ج- عند إخراج البيئات من الجهاز فى اليوم الأول والثانى توضع على درجة حرارة التحضين المناسبة حتى موعد التعقيم التالى وذلك فى حالة التعقيم المتقطع.

٣- التعقيم بالبخار تحت الضغط الجوي المرتفع

ويستخدم فى ذلك جهاز الأوتوكلاف Autoclave ويسمى بالمعقم بالبخار تحت ضغط وهو عبارة عن إناء إسطوانى من النحاس او من مخلوط من عدة معادن مثل تلك المستعملة في صنع الأجهزة الثقيلة وذلك لتحمل الضغط المرتفع داخل الجهاز . والجهاز له غطاء سميك مثبت بمشابك لولبية مع وجود جوان من الجلد لزيادة إحكام قفل الغطاء ، وينفذ من الغطاء كبسولة أمان وحنفية بخار ومانومتر لقياس الضغط . كما يوجد أسفل الجهاز

علامة لضبط مستوى الماء يعلوها رف مثقب ترص عليه المواد و الأدوات والأشياء المراد تعقيمها, كما يتصل الجهاز بمصدر كهرباء للتسخين.

فكرة عمل الجهاز

تبنى نظرية عمل جهاز الأوتوكلاف فى رفع درجة حرارة غليان الماء عن ١٠٠°م ، فمن المعروف أن الماء يغلى عند درجة ١٠٠°م عندما يكون ضغطه مساوياً للضغط الجوى المحيط به أما إذا تعرض للضغط الجوي المرتفع فإن درجة غليانه تزيد عن ذلك ، أى أن درجة الحرارة داخل الجهاز تتوقف على قيمة الضغط الذى يتوفر بداخله مع ملاحظة أن صفر تدريج المانومتر يكون مساوياً لضغط جوى واحد بدون تشغيل الجهاز. ويستخدم الأوتوكلاف فى تعقيم البيئات والمواد التى تتحمل مكوناتها درجات الحرارة المرتفعة دون تغير فى خواصها الطبيعية والكيماوية مثل بيئات الأجار المغذى والمرق المغذى والسليكا جيل والبيئات الخالية من السكريات، كذلك يستخدم فى تعقيم الشاش والقطن والأقمشة والملايات والبلاطى والفوط وسدادات وخراطيم الكاوتشوك علاوة على عينات التربة والمرشحات البكتيرية المختلفة وأصص الزرع والماء هذا بجانب اعدام المزارع الميكروبية الممرضة المراد التخلص منها.

تدريب (٥) : خطوات تشغيل الأوتوكلاف

يجرى هذا التدريب بغرض إكساب الدارس مهارة تشغيل هذا الجهاز الذى لا غنى عنه فى معامل ميكروبيولوجيا حتى يتعلم وبصورة معتادة الحصول على الأدوات والمواد المعقمة التى يتعامل معها كثيراً فى معمله وبصفة يومية .

خطوات التشغيل

١- تأكد من أن كمية الماء الموجودة بالجهاز كافية أى بعمق ٣-٤ بوصات.

٢- ضع الأدوات والمواد المزاد تعقيمها على الرف المثقب ثم وصل التيار الكهربى.

٣- ثبت الغطاء فى موضعه واحكم القفل تماما بواسطة المشابك الحديدية.

٤- إترك حنفية البخار مفتوحة عند بداية التشغيل حتى يتم طرد جميع الهواء الموجود داخل الجهاز، ثم إقفل الحنفية حيث أن مزيج الهواء والبخار لا يعطى درجات الحرارة المناسبة عند نفس الضغط مما يسبب عدم كفاءة التعقيم عندما يكون الضغط الظاهرى ١ ض ج كما هو موضح بالجدول التالى :

نسبة تفريغ الهواء	درجة الحرارة داخل الجهاز
تفريغ تام	١٢١°م
٣/٢ تفريغ	١١٥°م
٢/١ تفريغ	١١٢°م
٣/١ تفريغ	١٠٢°م

٥- عند وصول مؤشر المانومتر إلى الضغط المطلوب إحسب المدة اللازمة لتمام التعقيم طبقا للجدول التالى

مسلسل	درجة الحرارة	الضغط الجوى	المدة اللازمة لتمام التعقيم
١	١١١,٥ °م	٢/١ض ج	٣٠ دقيقة
٢	١٢١ °م	١ ض ج	١٥-٢٠ دقيقة
٣	١٢٧,٥ °م	١,٥ ض ج	٥ دقائق

٦- بعد إنتهاء فترة التعقيم إفصل التيار الكهربى وأترك الجهاز ليبرد ويعود المانومتر إلى الصفر ثانية لأن فتح الجهاز قبل وصول المانومتر إلى

الصفر يعرض البيئات السائلة الموجودة على درجة حرارة فوق ١٠٠ °م للضغط الجوى العادي فجأة مما يؤدى إلى فورانها بشدة فتندفع خارج العبوات وتفقد . وعموماً تزود الأجهزة الحديثة بإضافات لا تسمح بفتحها قبل أن ينخفض ضغط الجهاز إلى الدرجة المطلوبة.

٧- بعد وصول الضغط إلى الصفر إفتح صنبور البخار بالتدريج ليسمح بدخول الهواء حتى يتساوى الضغط داخل الجهاز وخارجه حتى يسهل فتحه.

٨- يراعى لف السدادات القطنية بورق البارشمنت غير الماص للرطوبة لتفادى تبللها.

٤-التعقيم على درجة الحرارة المنخفضة

ويتم فى هذه الطريقة تعقيم المواد التى تتلف إذا تعرضت لدرجة حرارة أعلى من ٥٧° م مثل سيرم الدم والمواد المحتوية على بروتين عموماً، ويتم تعقيمها على هذه الدرجة لمدة ساعة يومياً وعلى مدى ثمانية أيام متتالية باستخدام حمام مائى يعمل بالكهرباء وله منظم لضبط الحرارة على الدرجة المطلوبة.

ثالثا: التعقيم بالكيماويات

قسمت الكيماويات من حيث طبيعة تأثيرها على الميكروبات إلى أربعة أقسام هى:

١- مواد كيماوية قاتلة

وهى ذات تاثير مبيد للأطوار الخضرية للميكروبات و ليس من الضرورى قتل الجراثيم ، ومن أمثلتها الفينول بتركيز ٥٪ ، والكريزول

بتركيز ٣٪ وتستخدم فى تعقيم الأدوات الجراحية والمناضد ، وكذلك الكحولات مثل كحول الإيثايل بتركيز ٥٠-٧٠٪ لتعقيم الأيدى والبنشات بالإضافة إلى كلوريد الزئبقيك (السليمانى) بتركيز ٠,١٪ (١جم/لتر) لتعقيم المناضد والتعقيم السطحى للمحاصيل الدرنية ولدرنات البطاطس عند عزل الميكروبات الموجودة بداخلها وكذلك التعقيم السطحى للعقد الجذرية لمحاصيل البقوليات عند عزل بكتيرويدات الرايزوبيا من داخل العقد.

٢- مواد كيماوية مانعة

وهى تعوق نمو الميكروبات و تكاثرها و ليس من الضرورة قتلها مثل مركبات السلفا.

٣- مواد كيماوية حافظة

وهى تشبه الكيماويات المانعة في تأثيرها ومن أمثلتها بنزوات الصوديوم وتستخدم بنسبة ٠,١٪ (١جم/لتر) لحفظ الشربات والمربات وغيرها من المواد الغذائية .

٤- مواد كيماوية مطهرة

وهى مواد بعضها يقتل أنواع معينة من الميكروبات وبعضها يوقف نمو البعض الآخر من الميكروبات ، ومن أمثلتها الكلور ومركباته ويستخدم بنسبة ٢ جزء فى المليون لتطهير ماء الشرب ، وفوق أكسيد الهيدروجين وأكسيد الزنك لتطهير الجروح العميقة . وكذلك اليود المستخدم فى تطهير الجلد ، وكذلك قد تستخدم المطهرات الطيارة مثل الكلوروفورم والفورمالدهيد لتعقيم وحفظ سيرم الدم حيث يستخدم الكلوروفورم بنسبة ٠,٢٥٪ ويمكن إزالته بالتسخين على درجة حرارة 57^{o} .

رابعاً : التعقيم بالغازات

يعتبر إستخدام الغازات فى التعقيم من طرق التعقيم الكيماوى والتى أخذت إهتماماً متزايداً فى الآونة الأخيرة . ويستخدم غاز أكسيد الإيثيلين وبعض أبخرة الغازات الأخرى بصفة أساسية وعلى نطاق واسع فى تعقيم الأدوات الطبية والبلاستيكية كالسرنجات وأطباق بترى البلاستيك، والقسطرات المستخدمة فى العمليات الجراحية . وتجهز المستشفيات بغرف لهذا الغاز كجزء من مستلزمات التعقيم فى المستشفى وتتسع هذه الغرف لتعقيم المراتب، ويعتبر غاز أكسيد الإيثيلين غاز شديد السمية للفيروسات والبكتيريا والفطريات والجراثيم الداخلية شديدة المقاومة للحرارة ، وهو سهل التداول بالأجهزة المناسبة حيث يستخدم فى صورة أبخرة مضغوطة بواسطة أجهزة خاصة تشبه جهاز الأوتوكلاف المعدل ، كما أنه غاز آمن حيث يستخدم بنسبة ١٠٪ مخلوطاً بغاز ثانى أكسيد الكربون بنسبة ٩٠٪ ويمكن التخلص منه بالتهوية بعد الإنتهاء من عملية التعقيم.

خامساً : التعقيم بالترشيح

وتستخدم هذه الطريقة من التعقيم مع السوائل التى تتحلل وتفسد بالحرارة مثل سيرم الدم والإنزيمات والمحاليل السكرية والتوكسينات وبيكربونات الصوديوم حيث يتم سحبها خلال مرشحات خاصة ذات مسام ضيقة بالدرجة التى تمنع مرور الخلايا البكتيرية (0.45 µ) , ويتم السحب إما بالضغط السالب عن طريق تفريغ الهواء أسفل المرشح أو الضغط الموجب وذلك بالضغط العلوى على السائل المعرض للترشيح . وتزال الميكروبات من السوائل بواسطة المرشحات إما بالإزالة الميكانيكية مثل التأثير المماثل لعمل الغربال الناتج من حجز الثقوب الدقيقة للميكروبات ، أو بواسطة

إدمصاص المرشح للميكروبات لإختلاف الشحنات الكهربائية بين المرشح والميكروبات.

المرشحات البكتيرية :

١- مرشح تشمبرلاند Chamberland filter

وهو عبارة عن إسطوانة من الخزف غير المصقول ومقفلة من أحد طرفيها ويوجد منه أنواع مختلفة.

٢- مرشح بيركفيلد Berkefield filter

وهو عبارة عن شمعة مصنوعة من الدياتوم أو الإسبستوس وتوجد منه عدة أنواع تختلف بإختلاف حجم المسام.

٣- مرشح سايتس Seitz filter

وهو عبارة عن قرص من الإسبستوس مضغوط بين قرصين منقبين من المعدن ويعلو القرص العلوى قمع يوضع فيه السائل المراد تعقيمه.

٤- المرشح الغشائى Filter membrane

وهى مرشحات تصنع من مواد كيماوية مثل خلات السليلوز أو غشاء من البلاستيك ثقوبه ذات حجم صغير تكفى لحجز وإزالة البكتيريا من المحلول ، كما توجد أيضا أنواع من المرشحات الغشائية ذات ثقوب أصغر تزيل الفيروسات والجزيئات الدقيقة جدا بكفاءة . كما توجد مرشحات بكتيرية أخرى مثل مرشح الزجاج المصنفر Sintred-glass ومرشح سيلاس ذو الشمعة Selas candle type ومرشح ماندلر Mandler.

إحتياطات إستخدام المرشحات البكتيرية:

١- يعقم المرشح بجميع مشتملاته فى جهاز الأوتوكلاف قبل إستخدامه.

٢- يتم عمل إختبار دقة أو تمام التعقيم للسوائل المترشحة Sterility test وذلك بتلقيح جزء من المترشح فى بيئة مناسبة وحفظه على درجة الحرارة المناسبة , فإذا لم يظهر نمو خلال ٢٤ ساعة على هذه البيئة دل ذلك على كفاءة التعقيم.

٣- بعد إجراء الترشيح يلزم تنظيف المرشحات وذلك بإمرار تيار من الماء فى الإتجاه المعاكس ، وللتخلص من المواد البروتينية بستخدم محلول NaOH تركيز ٥ ٪ فيما عدا مرشح الزجاج المصنفر حيث يستخدم فى تنظيفه حمض H_2SO_4 مركز ساخن ، وفى حالة مرشح سايتس يجب الإستغناء عن القرص وإستبداله بآخر.

سادساً: التعقيم بالإشعاع

يعتبر الإشعاع من طرق التعقيم المستعملة مع بعض المواد الصيدلانية والمواد الغذائية حيث تستعمل أشعة مؤينة عالية الطاقة مثل أشعة جاما ذات القدرة العالية على الإختراق وأشعة الكاثود ، أما الأشعة فوق البنفسجية فهى لا تعتبر وسيلة كافية للتعقيم بسبب قلة نفاذية موجاتها وبالتالى فهى تستخدم فى تعقيم أسطح الأدوات والأوانى بجانب العنابر الكبيرة بمصانع الأدوية وغرف العمليات بالمستشفيات .

أسئلة:

١- أكتب النظرية التى تعتمد عليها عملية التعقيم المتقطع؟

٢- علل:

أ- الحرارة الرطبة أكفأ فى التعقيم من الحرارة الجافة.

ب- تعقم بيئة الجيلاتين المغذى فى جهاز أرنولد بطريقة التعقيم المتقطع.

جـ - تتنوع طرق التعقيم مع أن الغرض منها واحد.

د- عدم إستخدام الكيماويات فى تعقيم البيئات البكتريولوجية المعملية .

٣- أذكر طريقة تعقيم كل مما يأتي:

بيئة الأجار المغذي - بالطو المعمل - الماصات - بيئة لبن عباد الشمس - مشرط الطبيب - الماء - بيئة الأجار المغذى - حجرة العمليات - أطباق بترى - الشاش - إبرة التلقيح - الدوارق - أصص الزرع - المزارع الميكروبية الممرضة القديمة - بيكربونات الصوديوم - زيت البرافين - عينات التربة.

٤- ضع علامة √ أو X أمام العبارات الآتية :

أ- يتم تعقيم الماء فى الأوتوكلاف لأنه لا يتأثر بالحرارة المرتفعة.

ب- عند استخدام حرارة جافة فى التعقيم يلزم زمن ودرجة حرارة أقل منها فى حالة إستخدام الحرارة الرطبة.

جـ- بيئة لبن عباد الشمس تتكون من لبن فرز طازج ودليل عباد الشمس ويتم تعقيمها فى الأوتوكلاف.

د- بيئة بويون السكريات يتم تعقيمها فى جهاز أرنولد بطريقة التعقيم المتقطع خوفا من تحلل مكوناتها.

هـ- يتم تعقيم غرف العمليات باستخدام الأشعة فوق البنفسجية أو بغاز أكسيد الإيثيلين.

و- يتم تعقيم إبرة التلقيح عن طريق تعريضها للهب فقط.

ز- تعقم أطباق بترى البلاستيكية فى معقم الهواء الساخن بعد وضعها فى العلب الخاصة بها.

س- تعقم الأدوات المحتوية على سدادات قطنية فى الفرن على درجة ١٦٠°م لمدة ساعة.

٥- أذكر درجات الحرارة والمدة اللازمة لتمام التعقيم باستخدام المعقـم بـالهواء الساخن.

٦- ماهى الإحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل الأوتوكلاف.

٧- قسم المواد الكيماوية من حيث طبيعة تأثيرها على الميكروبات مع ذكر مثال لكلٍ منها .

٨- أذكر الطرق المختلفة لإزالة الميكروبات من السوائل المراد تعقيمها .

الدرس العملى الخامس

البيئات الغذائية المستخدمة فى تنمية البكتيريا

Cultivation Media Used in Bacterial Growing

أولا: البيئات السائلة Liquid media

أ- بيئة البويون المغذى Nutrient broth medium

تعتبر بيئة المرق المغذى من أكثر البيئات السائلة إستعمالاً فى مجال الميكروبيولوجيا وذلك لأنها بسيطة التركيب ، تصلح لتنمية الكثير من أنواع البكتيريا، علاوة على أنها تعتبر الأساس لتحضير كثير من البيئات الأخرى وذلك بإضافة مواد خاصة إليها لسد حاجة بعض الميكروبات الأخرى .

تدريب رقم (٦) : تحضير بيئة المرق المغذى

يجرى هذا التدريب بغرض تدريب الطالب على كيفية تحضير البيئات البكتيريولوجية اللازمة لنمو وتكاثر الميكروبات المختلفة والتى تستخدم فى معامل الميكروبيولوجيا سواء فى مصانع الأغذية والألبان أو معامل ميكروبيولوجيا الأراضى .

المواد والأدوات المطلوبة :

دوارق مخروطية ٢٥٠ مل ، ٥٠٠ مل – ماصات – سحاحات – حمام مائي – جهاز قياس درجة الحموضة (pH meter) – ميزان يعطى رقمين عشريين – مستخلص لحم – ببتون – ماء حنفية – محاليل صودا كاوية ١

عيارى – محاليل حمض هيدروكلوريك ١ عيارى – دليل البروموثيمول بلو Bromothymolblue .

خطوات العمل :

١- أذب مكونات البيئة فى ماء بارد وإن لزم الأمر فيكون على حمام مائى حتى يتم ذوبانها ، ثم رشح المحلول وأضف ماء مقطر لتعويض الفاقد بالتبخير.

٢- أضبط رقم الحموضة عند الرقم المطلوب وعادة ما يكون الوسط المتعادل وهو ٦,٨ – ٧ .

٣- قم بتوزيع البيئة فى أنابيب إختبار نظيفة بمعدل ٥ سم^{٣} فى كل منها أو فى دوارق مخروطية مناسبة ثم غطى بسدادة من القطن غير الماص.

٤- عقم البيئة فى جهاز الأوتوكلاف عند ١ ضغط جوى على ١٢١°م لمدة ٢٠ دقيقة.

٥- إحفظ العبوات المحتوية على البيئة المعقمة فى مكان مناسب لحين الإستعمال.

تدريب رقم (٧) : ضبط رقم الحموضة للبيئة المغذية

يجرى هذا التدريب بغرض تعريف الدارس كيفية ضبط درجة الحموضة أو القلوية لتمام التأكد من أن البيئة المحضرة مناسبة للميكروب المراد تنميته ، حيث أن معظم أنواع البكتريا الملوثة للأغذية والأوساط المختلفة تتطلب بيئات ذات تأثير متعادل أو يميل قليلاً ناحية القلوية ٧,٢ – ٧,٥ ، فى حين أن هناك أنواع معينة تتطلب درجة pH خاصة تنمو عليها جيداً ، ولذا يجب ضبط رقم حموضة البيئة المغذية حسب نوع الميكروب المراد تنميته .

خطوات العمل :

١- تؤخذ كمية معلومة من البيئة المحضرة بواسطة ماصة ويضاف إليها بضع نقاط من دليل البروموثيمول بلو لمعرفة درجة الـpH لها ، وحيث أن البويون حامضى فمن الطبيعى أن يظهر اللون الأصفر للدليل حيث أن الدليل يأخذ اللون الأخضر فى الوسط المتعادل وأزرق فى الوسط القلوى.

٢- تعادل الحموضة بكمية محددة من الصودا الكاوية ٠,١ ع فى وجود الدليل .

٣- إذا إتجه لون الدليل ناحية القلوية نتيجة خطأ فى التقدير يعاد التعادل بإستخدام HCl بتركيز ٠,١ ع مع حساب الكمية المستخدمة والتى عادلت الزائد من الصودا الكاوية

٤- تحسب كمية NaOH تركيز ٠,١ ع اللازمة بالضبط لمعايرة الكمية المحددة من البيئة عند pH ٧ ومنها تحسب كمية NaOH تركيز ١ ع اللازمة لمعايرة بقية البيئة.

مظاهر نمو البكتيريا على البيئات المغذية السائلة:

يجب أن تتوفر فى البيئات المغذية السائلة المستخدمة فى زراعة البكتيريا الملائم العناصر الغذائية اللازمة للنمو ، وعموماً يظهر النمو في المزارع السائلة بصور مختلفة هى:

١- تكوين عكارة Turbidity

حيث يكون النمو على البيئة السائلة على شكل سحابة مختلفة الكثافة منتشرة فى البيئة.

٢- تكوين غشاء Pellicle

حيث تظهر على سطح المزرعة السائلة تجمعات صغيرة من الخلايا المتشابكة مع بعضها.

جـ - تكوين راسب Precipitate

حيث توجد الخلايا راسبة في قاع الأنبوبة المحتوية على المزرعة السائلة، وتنتشر فى أنحاء المزرعة بالرج ثم ترسب مرة أخرى مع سكون البيئة .

تدريب رقم (٨) : تحضير بيئة بويون السكريات لإختبار التخمر

يجرى هذا التدريب بغرض تعليم الدارس كيفية تحضير البيئة المغذية التي تستخدم في التفرقة بين الميكروبات المختلفة من حيث قدرتها على تخمير الأنواع المختلفة من السكريات مع إنتاج حمض أو حمض وغاز وهى من البيئات المغذية المستخدمة في التعرف على الميكروبات الملوثة للأوساط المختلفة .

خطوات العمل:

١- حضر لتر من بيئة المرق المغذي بنفس الطريقة السابقة.

٢- أضف ٥ جرام ببتون زيادة إلى البيئة السابقة وأذبها بالتسخين على حمام مائي.

٣- أضف ماء مقطر لتعويض الفاقد بالتبخير.

٤- أضبط درجة الـpH عند الدرجة المطلوبة كما سبق ذكره .

٥- أضف ٥ جرام من السكر المراد إستخدامه لكل لتر بيئة .

٦- أضف ١ سم^{٣} من دليل البروموثيمول بلو إلى البيئة لإختبار تكون حموضة في البيئة نتيجة تحليل السكر المستخدم.

٧- وزع البيئة في أنابيب بمعدل ٧ سم^{٣} لكل أنبوبة.

٨- ضع بداخل كل أنبوبة إختبار أنبوبة درهام Durham tube في وضع مقلوب وذلك لإختبار تكون غاز من عدمه أثناء تحلل السكر ثم غطى

الأنابيب بسدادات من القطن غير الماص وعقم البيئة بطريقة التعقيم المتقطع بإستخدام جهاز أرنولد وإحفظها في مكان مناسب لحين الإستخدام.

تدريب رقم (٩) : تحضير بيئة لبن عباد الشمس

يجرى هذا التدريب بغرض إكساب الدارس مهارة تحضير هذه البيئة الضرورية والتى تستخدم فى الكشف عن التغيرات التى تحدثها البكتيريا فى اللبن حيث أن اللبن يعتبر بيئة صالحة لنمو الكثير من الميكروبات والتى يمكن تمييز بعضها عن البعض بالتأثير الناتج على هذه البيئة.

خطوات العمل:

١- أضف لكل لتر من اللبن الفرز الطازج ٥ سم^3 من دليل عباد الشمس تركيز ٥%.

٢- وزع البيئة في أنابيب إختبار نظيفة بمعدل ٧ سم^3 لكل أنبوبة ثم سدها بسدادات من القطن غير الماص.

٣- عقم البيئة بطريقة التعقيم المتقطع فى جهاز أرنولد ثم إحفظها فى مكان مناسب لحين الإستعمال.

ثانيا : البيئات الغذائية المصلبة Solidified cultivation media

لعزل وتنمية البكتيريا فإنها تحتاج إلى البيئات المغذية المجمدة ولذلك تجمد البيئات المغذية السائلة بإضافة بعض المواد التصليبية مثل الأجار أجار أو الجيلاتين فى حالة البكتيريا غير ذاتية التغذية أو إستخدام السليكا جيل كما فى حالة تنمية البكتيريا ذاتية التغذية مثل البكتيريا الكيموليثوتروفية. وعادة يفضل إستخدام الأجار عن الجيلاتين فى تصليب البيئات للأسباب الآتية:

١- الجيلاتين مادة بروتينية سهلة التحلل بواسطة كثير من أنواع البكتريا المحللة للبروتين مما يفقده خاصية التصلب ، بينما الأجار مادة كربوهيدراتية معقده التركيب ولا يمكن لمعظم أنواع البكتريا تحليله مما يجعله محتفظا بصلابته.

٢- عند تعريض الجيلاتين لدرجة حرارة أعلى من ١٠٠ °م أو على ١٠٠°م لمدة طويلة فإنه يفقد خاصية التصلب , لذا تستلزم بيئته معاملة خاصة عند التعقيم بعكس الحال فى الأجار فهو مادة لا تتأثر بالحرارة المرتفعة أو بطول مدة التعرض لها.

٣- درجة إنصهار وتجمد الجيلاتين منخفضة حوالى٢٥°م لذلك يستلزم الإحتفاظ بالبيئة المغذية المصلبة به على درجة حرارة منخفضة لتبقى على الحالة الصلبة ، وقد تكون هذه الحرارة غير ملائمة لنمو كثير من الميكروبات . أما الأجار فهو يتميز باحتفاظه بصلابته عند كل درجات الحرارة اللازمة لنمو الميكروبات حيث لا يسيل إلا فوق ٩٥°م أو ٩٨°م ولا يتصلب عند تبريده إلا عند ٤٢-٤٥°م مما يمكن معه تلقيح بيئة الأجار بالميكروبات وهي لا تزال سائلة دون خشية تأثرها.

٤- يستعمل الجيلاتين بنسبة ١٠-١٥% (١٠٠-١٥٠ جم/لتر), أما الأجار فيستعمل بنسبة ١,٥-٢% (١٥-٢٠ جم/لتر) لتصليب البيئات السائلة.

تدريب رقم (١٠) : تحضير بيئة الأجار المغذى أو الجيلاتين المغذى

يجرى هذا التدريب بغرض تنمية مهارة الدارس فى إستخدام المواد التصليبية فى تحضير البيئات المجمدة التى تحتاجها البكتيريا لنموها ونشاطها.

خطوات العمل :

١- إضف ١٥-٢٠ جم أجار إلى ١ لتر من بيئة المرق المغذى , أما فى حالة الجيلاتين فيتم إضافة ١٠٠-١٥٠ جم/لتر من نفس البيئة.

٢- إغلى المخلوط على حمام مائى فى الحالتين حتى تمام ذوبان المادة التصليبية.

٣- أضف ماء لتعويض الفاقد بالتبخير.

٤- إضبط درجة الحموضة عند الدرجة المطلوبة مع مراعاة السرعة حتى لا تبرد البيئة وتتجمد المادة.

٥- وزع البيئة المغذية فى أنابيب بمعدل ٤ سم^{3} لكل منها فى حالة الأجار المائل وبمعدل ٧ سم ^{3} لكل أنبوبة في حالة الأجار العميق أو الجيلاتين العميق وسد الأنابيب بسدادات من القطن غير الماص.

٦- عقم بيئة الأجار فى الأوتوكلاف عند ١ ض . ج لمدة ٢٠ دقيقة , أما بيئة الجيلاتين فتعقم بطريقة التعقيم المتقطع فى جهاز أرنولد , وتحفظ الأنابيب بعد تعقيمها فى مكان مناسب لحين الإستعمال.

هذا مع ملاحظة أن الجيلاتين لا يستخدم فى تصليب البيئات البكتيريولوجية السائلة إلا عند الرغبة فى التمييز بين الميكروبات المختلفة من حيث قدرتها على تحليل البروتين حيث أنه مادة بروتينية تفقد خاصية التصلب عند تحللها ميكروبيا حتي لو وضعت فى الثلاجة.

أسئلة:

١- علل :

أ- يفضل إستخدام الأجار عن الجيلاتين فى تصليب البيئات الغذائية السائلة.

ب- تعتبر بيئة المرق المغذي أكثر البيئات الغذائية إستعمالاً فـــى التجـــارب البكتريولوجية.

جـ- لا يستخدم الجيلاتين فى تصليب البيئات إلا فى حالة واحدة فقط.

د- إضافة دليل وأنبوبة درهام عند تحضير بيئات بويون السكريات.

٢- أ- قارن بين البيئات التفريقية والبيئات الإنتقائية.

ب- عرف البيئة البكتيريولوجية المغذية.

الدرس العملي السادس

زراعة البكتيريا

Bacterial Cultivation

تنتشر الكائنات الحية الدقيقة بأنواعها المختلفة النافعة والضارة فى جميع الأوساط البيئية الطبيعية مثل الهواء والماء والتربة وكذلك المواد الغذائية، ويندر أن يخلو منها مكان ، وهى تتواجد في صورة مختلطة وليست منفردة . وبعد إكتشاف أهمية الكثير من أنواع الكائنات الحية الدقيقة والدور الفاعل الذي تقوم به فى كثير من الأنشطة الحياتية الهامة وخاصة تلك التى تتعلق بالصناعات التخميرية المختلفة مثل الصناعات اللبنية وصناعة الخميرة والكحول والخل ، وكذلك صناعة الأدوية ، علاوة على دورها الفعال في مجال الزراعة وخصوبة التربة الزراعية ، أصبح من الضرورى الحصول على هذه الأنواع فى صورة مزارع نقية أو مزارع فردية . وذلك عن طريق عزلها من بيئاتها الطبيعية فى المعامل المخصصة وبطرق عزل خاصة ، ولا يتأتى ذلك إلا بتوفير الظروف الملائمة لنمو هذه الأنواع من حيث تجهيز البيئات والأوساط الغذائية المتخصصة والتى تشجع نمو الميكروب المطلوب دون غيره من الميكروبات ، وكذلك توفير درجة الحرارة الملائمة لنمو الميكروب المطلوب ، بالإضافة إلى مراعاة ظروف التهوية التى يحتاجها الميكروب المراد الحصول عليه فى صورة نقية أو فردية . وعموماً لا يمكن الحصول على هذه المزارع إلا إذا تم تهيئة كل هذه الظروف فى جو معقم وخالى تماماً من كل أسباب التلوث.

بيئات الزرع البكتيريولوجية Bacteriological Culture media

يستهدف هذا الدرس إكساب الدارس مهارة إختيار البيئة الغذائية الملائمة لتنمية البكتيريا بأنواعها المختلفة بغرض ضمان نجاح نموها على المستوى المعملى تمهيداً لإستعمالها في المجال الصناعى ، حيث أن الإختيار غير الجيد لمكونات البيئة أو إحتوائها على عناصر ثقيلة أو سموم أو مواد تسبب في وجود ضغط إسموزى عالى قد يؤدى إلى نمو محدود للكائن الحى وإعطائه نتائج غير مرضية وغير حقيقية أو أنها قد تؤدى إلى عدم النمو نهائياً .

تعريف بيئة الزرع البكتيريولوجية

يمكن تعريف البيئة الغذائية البكتيريولوجية بأنها الوسط الغذائى الذي تتوفر به المادة أو المواد اللازمة لنمو وتكاثر نوع معين من الميكروب تحت الدراسة سواء البكتريا ، الفطر أو الخميرة . وتستعمل البيئات البكتيريولوجية للأغراض التالية:

١- تنمية وحفظ الميكروب وإستكثاره.

٢- دراسة سلوك الميكروبات وتأثيرها على بعض المواد الموجودة فى البيئة

٣- دراسة الإحتياجات الغذائية للميكروب.

٤- إستكثار ميكروب معين دون بقية الميكروبات

٥- تشجيع الميكروب على إنتاج مادة معينة فى البيئة

تركيب بيئة الزرع البكتيريولوجية

تتحدد مكونات البيئة الغذائية البكتيريولوجية على أساس عدة متغيرات مثل التكاليف ومدى توفر مكوناتها وتركيبها الكيماوى ونسبة الكربون الميسر بها وكذلك على أساس فسيولوجيا الميكروب المراد تنميته . وبصفة عامة فإنه يجب أن تتوفر فى البيئة الغذائية المثالية الشروط التالية:

١- مصدر للنمو والبناء للطاقة يتوافق وطبيعة تغذية الميكروب المراد تنميته.

٢- بعض الفيتامينات التى تعمل كعوامل نمو Growth factors وكذلك المواد المنشطة للنمو ومصدرها مستخلص الخميرة أيضاً.

٣- الرطوبة الكافية حيث أنها الوسط المذيب لبقية مكونات البيئة .

٤- درجة الحموضة (الـ pH) المناسبة للميكروب المراد تنميته .

٥- إحتواء البيئة على مواد منظمة لدرجة الـ pH مثل فوسفات الكالسيوم .

٦- أن يكون الضغط الإسموزى للبيئة مناسباً للميكروب موضع الدراسة .

٧- أن تكون البيئة خالية من المثبطات أو المواد القاتلة للميكروب قيد الدراسة .

٨- درجة التهوية التى توافق حاجة الميكروب للأكسجين .

٩- درجة الحرارة المناسبة لنمو الميكروب والتى يمكن توفيرها والتحكم فيها عن طريق إستخدام الحضان.

أسس تقسيم بيئات الزرع البكتيريولوجية

تتنوع بيئات الزرع البكتيريولوجية وتتعدد لما يلى:

أولاً : الغرض من الإستعمال

أ- بيئات ذات فائدة عامة :

مثل بيئات تنمية وحفظ الميكروب وإستكثاره وهذه يجب أن تتوفر فيها جميع شروط البيئة الغذائية المثالية بحيث تناسب أغلب الكائنات الحية الدقيقة .

ب- بيئات ذات فائدة خاصة :

١- بيئات لدراسة سلوك الميكروب وتأثيره على بعض مواد البيئة ولدراسة إحتياجات الميكروب من المواد الغذائية

٢- بيئات إنتقائية Selective cultivation media : حيث يتم فيها إستكثار ميكروب معين دون باقى الميكروبات وهى الخطوة الأولى نحو عزل وتنقية الميكروب ويجب أن تتوفر فيها جميع إحتياجات الميكروب الغذائية والظروف التى يتطلبها لتساعده على النمو .

٣- بيئات لتشجيع الميكروب على إنتاج مادة معينة فى البيئة .

٤- بيئات تفريقية Differentiation cultivation media : وهى بيئات تحتوى على مواد كاشفة معينة تؤدى إلى تغيير فى مظهر النمو مثل بيئة الأيوسين وأزرق المثيلين Eosin methylene blue (EMB) والتى تستخدم للتفرقة بين أفراد بكتريا القولون.

٥- بيئات مدعمة Suplemented cultivation media : وهى بيئات عادية يتم تدعيمها بإضافة مواد طبيعية مثل سيرم الدم أو عصير الأنسجة النباتية أو الأنسجة الحيوانية وذلك لتنمية الميكروبات التى يصعب تنميتها على البيئات العادية fastidious microbes مثل بعض الميكروبات غير ذاتية التغذية .

٦- بيئات حفظ الميكروبات Preservation cultivation media: وهى البيئات التى تستخدم فى حفظ وتخزين السلالات البكتيرية فى صورة حية سواء كانت ميكروبات هوائية أو غير هوائية مع توفير الظروف التى تساعد على الحفظ أطول فترة ممكنة .

٧- بيئات التقدير الحيوى Bioassay cultivation media : وهى نوع من البيئات التى تستخدم فى التقدير الكمى لنوع من الفيتامينات أو الأحماض

الأمينية بطريقة حيوية أى بإستخدام نوع من الميكروبات يكون حساس للمادة المراد قياسها حيث يتناسب النمو الميكروبى مع تركيز المادة قيد الدراسة .

ثانياً : حسب التركيب

وتقسم البيئات على هذا الأساس إلى :

١- بيئات عضوية طبيعية

قد تستخدم بعض المكونات الطبيعية كبيئة زرع لتنمية الميكروبات مثل شرائح البطاطس والجزر وهى بيئات زرع سهلة التحضير وغير مكلفة ولذا تعرف بأنها غير محددة التركيب .

٢- بيئات معدنية تركيبية

وهى بيئات معروفة التركيب الكيميائى والتركيز ، ولذا تسمى محددة التركيب الكيماوى حيث يمكن تكرارها أكثر من مرة بنفس التركيب .

ثالثا : حسب القوام

وفيه تتقسم البيئات إلى :

أ- بيئات صلبة طبيعية

مثل قطع اللحم وشرائح الجزر والبطاطس المعقمة كذلك يستخدم الكبد وصفار البيض كبيئة غذائية طبيعية لتنمية وإكثار الفيروسات .

ب- بيئات سائلة

مثل بيئة البويون المغذى وبيئة لبن عباد الشمس لتنمية البكتيريا وبيئة تشابكس لتنمية الفطريات .

جـ- بيئات مصلبة

مثل بيئة البويون المغذى المصلبة بمادة الأجار أجار أو الجيلاتين أو البيئات المعدنية المصلبة بمادة السليكاجيل . والغرض من إستعمال هذه

المواد هو تنمية البكتيريا على هيئة مجاميع ومستعمرات منفصلة لكـــى يمكن عزلها بحالة فردية .

د- بيئات شبه صلبة

وهى بيئات سائلة يضاف إليها نسبة من مادة التصليب مثـــل الأجـــار (٥جم/لتر) وهي تستخدم لتنمية الميكروبات التى تنمو تحت ظـــروف شحيحة فى إحتياجاتها الهوائية حيث تنمو تحت سطح الوسط الغــذائى مثل البكتيريا من جنس *Azospirillum* .

أسئلة :

١- عرف بيئة الزرع Cultivation medium البكتيريولوجية .

٢- ما هى الأغراض التى تستخدم من أجلها بيئة الزرع المعملية .

٣- أذكر العوامل التى يجب توافرها فى بيئة الزرع المعملية .

٤- قسم بيئات الزرع البكتيريولوجية كما درست .

٥- ما هو الفرق بين البيئة الغذائية الصلبة وشبه الصلبة مع ذكر ميكـــروب ينمو فى كل حالة .

الدرس العملى السابع

عزل وتنقية البكتيريا

Isolation and Purification of Bacteria

لا توجد الأجناس الأنواع البكتيرية فى الطبيعة فى صورة منعزلة كل نوع بمفرده ، بل توجد مختلطة مع بعضها ، ولدراسة خواص كل نوع يتحتم عزله بحالة نقية بحيث لا يصبح في المزرعة إلا نوع واحد فقط من الميكروبات وهو المراد دراسته ، وتجرى عملية العزل بعدة طرق منها :

١- طريقة الأطباق المصبوبة Pouring plate method

٢- طريقة الأطباق المخطوطة Streaking plate method

أولاً : عزل البكتيريا بطريقة الأطباق المصبوبة

تعتمد فكرة هذه الطريقة على تخفيف العينة تحت الدراسة قبل زراعتها على البيئة الغذائية المناسبة وبذلك تنمو الميكروبات في مجاميع أو مستعمرات منعزلة عن بعضها حيث أن كل مستعمرة تكون ناتجة عن خلية ميكروب واحد أى فى مستعمرات فردية.

تدريب رقم (١١) : عزل البكتيريا بطريقة الأطباق المصبوبة

يجرى هذا التدريب بغرض تعريف الدارس كيفية عزل البكتيريا الموجودة بالأوساط المختلفة بطريقة الأطباق المصبوبة وكذلك تنقيتها.

الأدوات والمواد المطلوبة:

أنابيب بيئة أجار مغذى عميق - أطباق بترى معقمة - مزرعة بكتيرية مختلطة - ترمومتر - أنابيب بيئة أجار مغذى مائل - صبغة جرام .

خطوات العمل :

١- سيح ثلاث أنابيب بيئة أجار مغذى عميق فى حمام مائى بالغليان ، ثم برد إلى ٥٠°م.

٢- لقح الأنبوبة الأولى بغمسة إبرة من المزرعة المختلطة تحت شروط التعقيم، ثم رج الأنبوبة بين راحتى اليد لتوزيع البكتيريا أو باستخدام جهاز هزاز الأنابيب الكهربى vortex وذلك لتوزيع البكتيريا فيها جيداً حيث يعتمد نجاح هذه الطريقة على تفريد إنتظام توزيع الخلايا بالإنبوبة.

٣- خذ بالإبرة المعقمة ٢ غمسة إبرة من الأنبوبة الأولى وإنقلها للأنبوبة الثانية تحت شروط التعقيم ثم رج الأنبوبة جيداً.

٤- خذ بالإبرة المعقمة ٣ غمسات إبرة من الأنبوبة الثانية ، وإنقلها للأنبوبة الثالثة تحت شروط التعقيم ، ثم رج الأنبوبة جيداً.

٥- صب الأنابيب الثلاث في ثلاثة أطباق بتري معقمة مع تحريك الطبق بعد الصب حركة دائرية خفيفة منتظمة حتى تتورع بيئة الأجار المغذى بإنتظام فى الأطباق وكذلك تتوزع الميكروبات به ، ثم رقم الأطباق وإتركها لتتجمد .

٦- ضع الأطباق مقلوبة في الحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ساعة.

٧- بعد إنتهاء فترة التحضين إختر بعض المستعمرات المنعزلة المتباعدة، وجهز منها غشاء ، وإصبغه بطريقة جرام وإفحصه فإذا ظهر بعد الفحص أن المستعمرة نقية يلقح منها أنبوبة بها بيئة أجار مغذى مائل

وتحضن لتنمو، وبذلك يتم الحصول على مزرعة فردية لكل من الميكروبات الموجودة فى العينة تحت الدراسة .

ثانياً : عزل البكتيريا بطريقة الأطباق المخطوطة

التخطيط Streaking هو نشر الخلايا الميكروبية على سطح بيئة صلبة أى محتوية على الآجار، بإبرة ذات عقدة loop أو إبرة منحنية الطرف bent needle ، ويطلق على الطبق المجهز بالتخطيط مسمى طبق مخطوط streak plate ، والغرض من التخطيط هو تقليل عدد البكتيريا العالقة بإبرة التلقيح تدريجياً بحيث فى نهاية خطوط التلقيح تصبح الميكروبات متباعدة فى الطبق وتنمو وتكون مستعمرات فردية منعزلة .

تدريب رقم (١٢) : عزل البكتيريا بطريقة الأطباق المخطوطة

يجرى هذا التدريب بغرض إكساب الدارس مهارة عزل البكتيريا الموجودة بالأوساط المختلفة بطريقة الأطباق المخطوطة وكذلك تنقيتها.

الأدوات والمواد :

أنابيب بيئة أجار مغذى عميق – أطباق بترى معقمة – مزرعة بكتيرية مختلطة – ترمومتر – أنابيب بيئة أجار مغذى مائل – صبغة جرام .

خطوات العمل:

١- سيح أنبوبتين من بيئة أجار مغذى عميق في حمام مائى يغلى ، ثم برد إلى ٥٠°م ، وصب محتويات كل أنبوبة في طبق بتري معقم مع إدارة الطبق بهدوء حتى تتوزع البيئة في كل الطبق بإنتظام .

٢- إترك الأطباق حتى تتجمد البيئة .

٣- خذ بإبرة التلقيح بعد تعقيمها غمسة إبرة من المزرعة البكتيرية المختلطة، ثم إفتح الطبق بمقدار ما يسمح بدخول الابرة ثم خطط بيئة

الأجار المغذى خطوط متوازية بخفة مع الحرص على عدم تجريح بيئة الأجار المغذى .

٤- بنفس الإبرة وبدون تعقيمها خطط بها الطبق الثانى .

٥- رقم الأطباق وضعها مقلوبة في الحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ساعة .

٦- بعد الإنتهاء من فترة التحضين إفحص الأطباق وإختر مستعمرات منعزلة ومتباعدة وإجرى عليها ما سبق في التمرين السابق للحصول على مزارع فردية على بيئة الأجار المغذى المائل .

طرق حفظ المزارع البكتيرية

بعد الحصول على مزارع بكتيرية فردية يجب المحافظة عليها أطول فترة ممكنة ويتم ذلك بعدة طرق كما يلى :

١- التنمية على بيئة الأجار المغذى مع إعادة الزرع بشكل منتظم كل ثلاثة شهور مع الحفظ فى الثلاجة .

٢- خفض النشاط الأيضى للميكروبات عن طريق تغطية المزارع بطبقة من الزيت المعدنى أو عن طريق التبريد .

٣- التجفيد وهو شائع الإستخدام لسهولته وللثبات الذى يتيحه للمزرعة بالمقارنة بالطرق السابقة ولكن هذه الطريقة مكلفة .

٤- الحفظ تحت درجات حرارة منخفضة جدا من -٧٠ إلى -١٩٦ .

أسئلة :

١- إذكر طرق عزل وتنقية البكتيريا فى صورة مزارع فردية.

٢- إشرح الفكرة التى تعتمد عليها عملية عزل وتنقية الميكروبات ؟

٣- تكلم الطرق المتبعة لحفظ المزارع البكتيرية.

٤- ما هو الفرق بين المزرعة الفردية و المزرعة النقية .

٥- أكتب لماذا تجرى التجارب المعملية فى مكررات .

الدرس العملى الثامن

المزارع البكتيرية

Bacterial Cultures

يستهدف هذا الدرس إلى تنمية معرفة الطالب بأنواع المزارع البكتيرية والإجراءات اللازمة للحصول عليها فى صورة نقية وكذلك إلمام الطالب بالإحتياطات الواجب مراعاتها عند إستخدام الحضان المستخدم في تنمية الميكروبات مما يؤهله للعمل فى معامل الميكروبيولوجيا الملحقة بمصانع الأغذية والألبان والأراضى وغيرها .

أنواع المزارع البكتيرية

يمكن تعريف المزرعة البكتيرية بأنها عبارة عن بيئة مغذية Nutritive medium عليها نمو بكتيري Bacterial growth ويمكن تقسيم المزارع البكتيرية إلى عدة أنواع حسب الأسس الأتية :

أ- أنواع الميكروبات :

١. مزارع فردية Single cultures

وهى تلك التى تحتوى على نوع واحد من الميكروبات وتسمى axenic culture ، أما إذا كانت الميكروبات نقية أيضاً من الناحية الوراثية فتسمي pure culture

٢. مزارع مختلطة Mixed culture

وهى تلك التى تحتوى على نوعين أو أكثر من الميكروبات.

ب- نوع البيئة :

١.مزارع الأطباق Plate cultures

وهى عبارة عن ميكروبات منماة على بيئة صلبة فى طبق بترى.

٢.مزارع مائلة Slope cultures or slants

وهى عبارة عن ميكروبات منماة على بيئات صلبة مائلة فى أنابيب إختبار.

٣.مزارع الوخز Stab cultures

وهى عبارة عن ميكروبات أدخلت إلى البيئة عن طريق وخز جزء من النمو الميكروبى على طرف إبرة التلقيح المستقيمة .

٤.مزارع الإهتزاز Shake cultures

وهى ناتجة من تلقيح بيئة صلبة بالميكروب بعد إسالتها ثم تركها تتجمد.

٥.مزارع سائلة Liquid cultures

وهى عبارة عن ميكروبات نامية على بيئات سائلة.

التلقيح الميكروبى Microbial inoculation

هو إدخال ميكروبات حية أو مواد محتوية على ميكروبات حية فى بيئة مغذية وتجرى بواسطة إبرة التلقيح . وتختلف طرق التلقيح حسب نوع البيئة المراد تلقيحها وتشمل تلك الطرق تلقيح البيئات المائلة ، تلقيح البيئات الصلبة وتتضمن طريقة الوخز أو الإهتزاز فى أنابيب إختبار ، تلقيح البيئات السائلة فى أنابيب إختبار أيضاً ، تلقيح البيئات المستوية فى أطباق بترى .

فترة الحضانة Incubation period

هى الفترة اللازمة لحفظ الميكروب على درجة الحرارة المثلى لنموه ونشاطه حتى يتكاثر ويعطى كم وافر من النمو يمكن رؤيته بالعين المجردة وتتم فترة الحضانة داخل جهاز خاص يسمى الحضان Incubator.

تدريب (١٣) : كيفية تشغيل الحضان

يجرى هذا التدريب بغرض تعريف الدارس كيفية تشغيل الحضان بالطريقة المناسبة للحفاظ على نقاوة المزارع و سلامتها من التلوث بميكروبات أخرى .

خطوات العمل :

جهز بيئاتك الملقحة بأنواعها المختلفة والمعدة للتحضين وضعها فى الحضان مع مراعاة الإجراءات التالية:

١- إحذر من إزدحام الحضان بالمزارع لتضمن إنتظام توزيع درجة الحرارة.

٢- ضع أنابيب المزارع السائلة قائمة داخل أسبتة سلكية طوال فترة الحضانة أو توضع فى حوامل معدنية او خشبية .

٣- ضع الأطباق إما فردية أو فى مجاميع لا تزيد عن أربعة أطباق للمجموعة الواحدة لضمان توزيع الحرارة .

٤- ضع الأطباق مقلوبة فى الحضان طوال فترة الحضانة لضمان ما يلى:

أ- إنتظام توزيع درجة الحرارة على الميكروبات النامية بها.

ب- عدم تكثف البخار على السطح الداخلى للغطاء مما ينجم عنه تساقط قطرات من الماء بعد تجميعها على سطح البيئة فتختلط المستعمرات البكتيرية النامية عليها مما يصعب معه إتمام عملية عزل الميكروبات بحالة نقية .

ج- عدم تكثف البخار والذى لو حدث يزيد من إحتمال تلوث البيئة التى بالميكروبات خلال ماء التكثيف.

د- الإحتفاظ برطوبة البيئة حيث أن ذلك يقلل من فرص البخر وبالتالى لا تزيد إسموزية البيئة ويستمر الميكروب فى نشاطه بحالة جيدة .

٥- إذا أردت حفظ المزارع لمدة طويلة فإنه يجب عليك منع التبخير وجفاف البيئة وذلك بتغطية السدادات القطنية بغطاء من السيلوفان أو إستعمال الزجاجات محكمة القفل.

٦- إحذر من فتح الحضان طوال فترة الحضانة إلا للضرورة القصوى حتى لا تنخفض درجة الحرارة نتيجة لذلك مما يؤثر سلباً على نمو الميكروبات تحت الدراسة .

أسئلة:

١. بماذا تعلل وضع أطباق بترى المحتوية على المزارع البكتيرية مقلوبة في الحضان طوال فترة الحضانة؟
٢. عرف كل مما يأتي: التلقيح - الحضانة - المزرعة البكتيرية.
٣. أذكر الفرق بين كل من:
   أ. المزرعة الفردية والمزرعة المختلطة.
   ب. مزارع الوخز ومزارع الإهتزاز.
٤. أذكر خمسة فقط من الإحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل الحضان.

الدرس العملى التاسع

طرق قياس النمو الميكروبى

Measurement of Microbial Growth

يمكن معرفة التعداد الميكروبى فى أى عينة بعدة طرق مختلفة، وهذا بالطبع للحكم على مدى تلوثها . وهذه الطرق يجب أن تعبر عن تعداد الخلايا مثل طرق العد المباشرة Direct methods أو الطرق المزرعية Cultural methods أو بالطرق غير المباشرة Indirect methods ولكل من هذه الطرق عيوبه ومميزاته كما يلى :

أولاً : الطرق المباشرة Direct methods

يتم حصر التعداد الميكروبى فى هذه الطرق بواسطة عملية عد مباشر للخلايا الميكروبية وذلك باستخدام تكبير مناسب بواسطة الميكروسكوب . تتميز هذه الطرق بالسرعة وقلة التكاليف وقلة الأدوات المستخدمة ولكنها غير دقيقة لأنها تقدر كل من الخلايا الحية والميتة وأحياناً توجد عينات أغذية يصعب فيها التفرقة بين الخلايا الميكروبية وبعض مكونات العينة . ومن هذه الطرق :

١- شريحة العد Counting slide

وهى شريحة مشابهة لشريحة عد خلايا الدم Haemocytometer وفيها يقسم مربع العد إلى مربعات صغيرة ذات إرتفاع معين وفقاً لما يراد عده ففى حالة عد خلايا الدم أو خلايا الخميرة تستعمل شريحة إرتفاع المربع فيها يكون 0.1 mm بينما فى حالة البكتيريا تستعمل شرائح إرتفاع المربع

فيها 0.02 mm ذلك أن خلايا البكتيريا صغيرة الحجم مقارنة بالخلايا الأخرى . ولكن يشترط فى هذه الطريقة خبرة فى التحضير حيث لا يستخدم فيها صبغات ويصعب الأمر أكثر فى حالة عد البكتيريا علاوة على عد البكتيريا ذات الفلاجلا التى تتحرك من مربع إلى آخر وبذلك تؤدى إلى نتائج غير دقيقة .

٢- شريحة بريد Breed slide

يتم نشر وتوزيع حجم معين من العينة موضع الدراسة على الشريحة بواسطة ماصة معينة سعتها 0.01 ml أو باستخدام إبرة تلقيح قياسية Standard loop . وبعد أن تنشر العينة جيداً تترك لتجف ثم تثبت وتصبغ ثم تفحص بالعدسة الزيتية المنغمسة بفحص عدد من المجالات يؤخذ متوسط العدد ثم يطبق فى معادلة خاصة للحصول على عدد الخلايا فى ١ مل من العينة قيد الدراسة .

٣- طريقة التناسب Proportional method

فى هذه الطريقة يؤخذ حجم معلوم من العينة قيد الدراسة وليكن 0.1 ml وتخلط جيداً بنفس الحجم 0.1 ml من خلايا دم معروف عدد خلاياه مسبقاً باستخدام شريحة العد Haemacytometer وتنشر بواسطة إبرة تلقيح كمية من هذا المخلوط ثم تصبغ بصبغة بسيطة مثل الفوكسين أو بصبغة مثل صبغة جرام ثم تعد الخلايا الميكروبية وخلايا الدم فى كل حقل ميكروسكوبى وبذلك يتم حساب عدد الخلايا الميكروبية كالآتى :

$$\text{عدد الخلايا الميكروبية} = \frac{\text{متوسط عدد الخلايا الميكروبية فى الحقل الواحد}}{\text{متوسط عدد خلايا الدم فى الحقل الواحد}} \times \text{عدد خلايا الدم فى ١ مل}$$

٤- طريقة الترشيح Filtration method

فى هذه الطريقة يستخدم ورق ترشيح من نوعية خاصة مصنوع من السليلوز مثل ما تنتجه شركة Milipore corporation, USA ذو مسام معلومة القطر وبذلك يقوم بحجز الخلايا الميكروبية ولذلك تختلف مسام الورق وفقاً لما يستخدم من أجله حيث يختلف المرشح المستخدم لحجز البكتيريا (0.45µ) عن ذلك المستخدم لحجز جراثيم الفطر أو ذلك المستخدم لحجز خلايا الخميرة . وتتم هذه الطريقة بترشيح 10 ml من العينة قيد الدراسة خلال المرشح . يضاف زيت السيدر لورقة الترشيح وبذلك تصبح منفذة للضوء وهنا تستطيع أن تقوم بعد الميكروبات على ورق الترشيح .

٥- استخدام العداد Coulter counter

هو عبارة عن جهاز إلكترونى يستخدم لعد أى جزيئات موجودة فى أى عينة سائلة بغض النظر عن طبيعة هذه الجزيئات . ويمر السائل تحت الدراسة خلال فتحة ذات قطر يتراوح بين 10-100µ ثم تقاس المقاومة الكهربائية خلال هذه الفتحة والتى تتناسب مع كمية الجزيئات الموجودة فى العينة السائلة والتى يتم تسجيلها فى صورة إشارة إلكترونية .

ثانياً : الطرق المزرعية Cultural methods

فى هذه الطرق يستعمل سلسلة من التخفيفات Decimal dilutions المناسبة ويسمح لها بالنمو فى وسط غذائى صلب على درجة حرارة معينة مناسبة وفترة تحضين مناسبة ينمو الميكروب فى صورة مستعمرات colonies حيث تعطى كل خلية مستعمرة واحدة وبذلك يعبر عدد المستعمرات عن عدد الخلايا الموجودة بالعينة قيد الدراسة . ومن هذه الطرق الآتى :

١- طريقة العد بالأطباق Plate count method

تستخدم هذه الطريقة فى تقدير عدد الخلايا البكتيرية كمياً . وكما سبق ذكره تخفف العينة بدرجة مناسبة ثم يؤخذ 0.1 ml من التخفيف ويوضع فى طبق بترى معقم ثم يضاف إليه البيئة الغذائية بحيث لا تزيد ولا تقل درجة حرارتها عن ٤٥°م وتخلط البيئة بالعينة جيداً ثم تترك الأطباق حتى تتصلب . توضع الأطباق بعد ذلك فى وضع مقلوب فى جهاز الحضان على درجة حرارة مناسبة . بعد ذلك تعد المستعمرات الناتجة فى الأطباق ثم يضرب العدد الناتج والذى يمثل متوسط ثلاث مكررات فى مقلوب التخفيف ليعطى عدد الخلايا البكتيرية فى العينة الأصلية. وفى هذه الطريقة تستبعد الأطباق ذات المستعمرات الكثيرة والمتداخلة وذات الأعداد الكبيرة أى فوق ٣٠٠ مستعمرة أو تلك ذات العدد القليل أى ١٠ مستعمرات وقد تستعمل العدسات المكبرة فى عد المستعمرات أو استخدام عدادات خاصة لذلك مما يسهل عملية عد المستعمرات البكتيرية فى الأطباق . وقد تستخدم زجاجات ذات جوانب مفلطحة بدلاً من الأطباق والتى تحضن على جانبها خاصة فى حالة تنمية الفطريات . ويعاب على هذه الطريقة قلة العدد الناتج عن الحقيقة حيث لا يتاح لكل الخلايا الظروف المناسبة للنمو من حرارة وتهوية وفترة تحضين وغير ذلك مثل تركيب الوسط الغذائي المستخدم فى الإنماء . هذا علاوة على كثرة التكلفة وطول الوقت اللازم وكثرة المجهود المبذول .

٢- طريقة فروست Frost little plate

فى هذه الطريقة تجرى التخفيفات كما سبق فى الطريقة السابقة بإضافة ١ مل من العينة تحت الدراسة إلى 99.0 ml من الماء المقطر ثم يجرى عمل سلسلة من التخفيفات للعينة فى البيئة بدلاً من الماء . ثم يؤخذ 0.5 ml من البئة الملقحة على شريحة زجاجية معقمة ثم تحضن لمدة ٨-١٠

ساعات على درجة حرارة مناسبة ثم تثبت الشريحى وتصبغ ثم يجرى عملية العد بالعدسة الزيتية المنغمسة .

٣- طريقة التخفيف Dilution method

فى هذه الطريقة يتم تخفيف العينة مباشرة فى أنابيب بها 9.0 ml مرق مغذى ثم تحضن الأنابيب لفترة مناسبة على درجة حرارة مناسبة حتى تنمو الميكروبات فى صورة عكارة فى الأنابيب . ويؤخذ أخر تخفيف يظهر به عكارة مثل تخفيف 1/100000 فيكون التعداد الميكروبى فى العينة الأصلية 100000 خلية بكتيرية فى 1.0 ml من العينة الأصلية .

٤- المرشحات الجزيئية Molecular filters

وهذه المرشحات عبارة عن أغشية سليلوزية ذات مسام دقيقة معلومة القطر والمساحة بحيث يحتوى السم^{2} الواحد من المسطح على حوالى ٥٠ مليون من المسام وبذلك يمكن الحصول على مرشحات ذات مسام قطرها ١٠ ملليمكرون وهذه تقابل أصغر الفيروسات فى الحجم . وهناك أنواع ذات مسام قطرها ٠,٣ – ٠,٨ ميكرون يمكن إستعمالها لعزل خلايا البكتيريا .

فى هذ الطريقة يمرر حجم معلوم من العينة تحت الدراسة خلال المرشح الذى تم تعقيمه وبذلك يتم حجز الخلايا البكتيربة على ورق الترشيح والذى ينقل إلى طبق بترى به بيئة غذائية مناسبة ثم تحضن الأطباق على درجة حرارة مناسبة وفترة تحضين مناسبة حتى تنمو المستعمرات البكتيرية. بذلك يمكن عد الخلايا البكتيرية فى ١سم^{2} حيث تقسم ورق الترشيح إلى مساحات مربعة الشكل معلومة المساحة ومن ثم يمكن حساب التعداد البكتيري فى العينة الأصلية .

ثالثاً : الطرق غير المباشر Indirect methods

فى هذه الطرق تقاس بعض التفاعلات الناتجة عن النشاط الفسيولوجى للخلايا بدلاً من تقديرها كمياً . يمكن تقدير كمية النيتروجين الميكروبى الى يدل على عدد الخلايا حيث يتناسب كمية النيتروجين الكلى مع عدد الخلايا الموجود بالعينة تحت الدراسة . ويمكن كذلك قياس بعض التغيرات التى تتناسب مع الزيادة الخلوية فى الوزن والعدد وهذه تتميز بالسرعة والسهولة ولكنها تتطلب الدقة وظروف تقدير قياسية موحدة وتحتاج هذه الطرق كمية كبيرة من الخلايا علاوة على أن هناك بعض القياسات يشترك فيها الخلايا الحية والميتة معاً .

١- طريقة قياس العكارة Turbidimetric method

تقدر عكارة العينات بواسطة جهاز colourimeter وذلك عند نمو الميكروب فى بيئات سائلة . وتعتبر هذه الطريقة من الطرق الشائعة الإستعمال حيث توجد علاقة بين الزيادة فى قيمة قياس عكارة البيئة السائلة المستخدمة فى الإنماء والزيادة فى الوزن فى نفس الوقت المستخدم فى القياس . وتتم عملية التقدير بأخذ كمية معلومة من البيئة ثم تجفف على ١٠٥°م لمدة ٢٤ ساعة وبذلك توجد علاقة خطية بين الوزن الجاف (mg) فى 10 ml بيئة غذائية ثم يستخدم المنحنى القياسى سابق التحضير لإيجاد القيم المجهولة للعينات قيد الدراسة .

٢- الطريقة الحجمية Volumetric method

يتم أخذ حجم معلوم من الوسط المراد دراسته ثم يعرض للطرد المركزى المتدرج فى أنابيب لها سعة كلية تعادل 10 ml وبعد عملية الفصل يتم تقدير الوزن الجاف للخلايا الناتجة . أما فى حالة الفطريات يتم ترشيح

الوسط المراد دراسته للحصول على الميسليوم الفطرى ثم يقدر الوزن الجاف للميسليوم الفطرى الناتج بعد تجفيفه على ١٠٥°م لمدة ٢٤ ساعة .

٢- طريقة التغير الحيوى **Biological change method**

وفى هذه الطريقة يتم تقدير الزيادة فى نيتروجين العينات، نتيجة النمو الميكروبى أو زيادة أى من مكونات الخلية مثل الكربون أو الفسفور أو الأحماض النووية سواء DNA أو RNA أو كليهما أو تقدير البروتين الكلى Total protein ويعاب على هذه الطريقة أنها لا تفرق بين الخلايا الحية والميتة .

وتشمل هذه الطريقة أيضاً على التقديرات الخاصة باستهلاك بعض المواد المضافة للوسط الغذائي والتى يستخدمها الميكروب فى نموه كمصدر للطاقة مثل الجلوكوز أو أى من السكريات الأخرى أو مصدر نيتروجينى مثل الأمونيا أو النترات . كذلك تشمل هذه الطريقة على قياس بعض المركبات التى تنتج فى الوسط الغذائى أثناء النمو الميكروبى من إنتاج CO_2 أو تقدير بعض الأحماض الأخرى .

الدرس العملي العاشر

العوامل المؤثرة على نمو البكتيريا

Factors Affecting Bacterial Growth

يهدف هذا الدرس إلى تعريف الطالب بالعوامل التى تؤثر على نمو البكتيريا ، وكيفية تهيئة أنسب هذه العوامل للحصول على أعلى نمو للمزارع البكتيرية والمحافظة عليها . وكذلك يهدف الدرس إلى تدريب الطالب على كيفية التخلص من الميكروبات الضارة . ويوجد العديد من العوامل التى تؤثر على نمو وتأقلم البكتيريا فى بيئاتها الطبيعية وهى عوامل فيزيائية وكيميائية وحيوية وسوف نناقش فيما يلى تأثير كل من هذه العوامل كالآتى :

أولاً : العوامل الفيزيائية

وهى عبارة عن عوامل طبيعية تعتمد في تأثيرها على أسس فيزيائية مثل الحرارة ، الإشعاع ، الضغط الإسموزي ، تركيز أيون الهيدورجين (pH)، والأكسجين .

تدريب (١٤) : تأثير درجة الحرارة على النمو الميكروبى

تعتبر درجة الحرارة أحد العوامل الهامة التى تؤثر على النمو الميكروبى . وكل نوع ميكروبى يتميز بدرجة حرارة مثالى optimal وهى الدرجة التى عندها يكون النمو أكثر ما يمكن ، ودرجة حرارة صغرى minimal وهى أقل درجة حرارة يمكن أن ينمو عندها الميكروب ، وأيضاً درجة حرارة قصوى maximal وهى أعلى درجة حرارة يمكن أن يحدث

عندها نمو للميكروب . من ذلك نرى أن النطاق الحرارى لنمو الميكروب ينحصر بين الدرجتين الصغرى والقصوى. والتدريب التالى يوضح تأثير درجة الحرارة على نمو بعض الأجناس والأنواع البكتيرية.

الأدوات والمواد المطلوبة :

مزارع بكتيرية عمرها ٢٤ ساعة من *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* و *E. coli* و *B. stearothermophilus* – بيئة مرق مغذى – أنابيب إختبار.

خطوات العمل :

١- وزع بيئة المرق المغذى فى أنابيب إختبار ثم عقمها.
٢- خصص لكل ميكروب ٥ أنابيب من بيئة المرق المغذى المعقمة.
٣- بعد إجراء التلقيح بالميكروبات ، قسم الأنابيب جميعها إلى ٥ مجاميع، ويتم تحضين أنبوبة من كل مجموعة على درجة من درجات الحرارة التالية : ٥ ، ٢٠، ٣٧ ، ٤٥ ، ٥٥°م وذلك لمدة ٤٨ ساعة.
٤- بعد إنتهاء فترة التحضين ، إفحص المزارع فى كل مجموعة ثم قدر كمية النمو وسجل النتائج فى جدول كالتالى:

إسم الميكروب	درجة حرارة التحضين				
	٥°م	٢٠°م	٣٧°م	٤٥°م	٥٥°م
Pseudomonas fluorescens					
Bacillus subtilis					
B. stearothermophilus					
E. coli					
Micrococcus sp					

تدريب (١٥) : تأثير الأشعة على النمو الميكروبى

يجرى هذا التدريب بغرض تعريف الطالب بالأضرار الناتجة من تعرض الكائنات الحية الدقيقة للأشعة فوق البنفسجية ، حيث أنها تحدث تأثيراً مطفراً أو مميتاً للميكروبات . ونظراً لذلك فإن الأشعة فوق البنفسجية تستخدم فى التعقيم كما سبق إيضاحه .

الأدوات والمواد المطلوبة:

عدد ٥ أطباق بترى معقمة – عدد ٥ أنابيب أجار مغذي معقمة – لمبة الأشعة فوق البنفسجية (٢٠٠-٣٠٠ نانومتر)- صبغة كريستال بنفسجى (١٪) – مزارع بكتيرية لكل من *Pseudomonas fluorescens* و *Sarcina lutea* و *Bacillus subtilis* و *Micrococcus* sp.

خطوات العمل:

١- صب الأجار المغذى الذي تم إسالته فى أطباق بترى وأتركه ليبرد.
٢- قسم قاعدة كل طبق إلى أربعة أقسام.
٣- لقح كل قسم من الأقسام السابقة بميكروب من الميكروبات الأربعة السابقة مستخدماً إبرة تلقيح معقمة فى كل مرة.
٤- عرض الأطباق الملقحة إلى لمبة الأشعة فوق البنفسجية على فترات صفر ، ٥، ١٠ ، ٢٠ ، ٣٠ ثانية.
٥- حضن الأطباق على ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة .
٦- لاحظ المستعمرات البكتيرية من حيث نظام النمو غير الطبيعى أو تثبيط النمو أو تغيرات اللون مقارنة بالكنترول.
٧- إصبغ الميكروبات التى نمت على سطح الأجار بطريقة الصبغ المركب بإستخدام صبغة الكريستال البنفسجى.

٨- إفحص بالعدسة الزيتية ثم قارن بين الميكروبات التـــى تـــم تعريضـــها للأشعة فوق البنفسجية على فترات مختلفة وتلك التى لم تتعرض للأشعة.

٩- سجل النتائج التى حصلت عليها فى الجدول التالى:

إسم الميكروب	زمن التعرض للأشعة فوق البنفسجية (ثانية)				
	صفر	٥	١٠	٢٠	٣٠
P. fluorescens					
B. subtilis					
Sarcina lutea					
Micrococcus sp					

تدريب (١٦) : تأثير الضغط الإسموزى على النمو الميكروبى

يعتبر الضغط الإسموزى أحد العوامل الهامة التى تؤثر على دخـــول الماء والمواد الغذائية من البيئة إلى داخل الخلية البكتيرية والعكس . والخلايا البكتيرية تكون فى حالة بلزمة plasmolysis عندما تتواجد فى محلول ذو ضغط إسموزى مرتفع ، وتنتفخ إذا تواجدت فى بيئة ذات ضغط إســموزى منخفض حتى تنفجر Plasmoptysis. والتدريب التالى يوضح تأثير الزيـــادة فى الضغط الإسموزى على البكتيريا .

الأدوات والمواد المطلوبة:

مـــزارع عمرهـــا ٢٤ ســـاعة لكـــل مـــن *E. coli* و *B. subtilis* و*Micrococcus* sp. نامية فى بيئة مرق مغذي – محلول ٢٧٪ من كلوريـــد الصوديوم – محلول ٤٠٪ سكروز – بيئة مرق مغذي.

خطوات العمل :

١- حضر ثلاث مجاميع من الأنابيب كل مجموعة عبارة عن ٣ أنابيب مرق مغذي وتحتوى على تركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم (٥، ١٠، ١٥٪). ثلاث مجاميع أخرى تحتوى على تركيزات مختلفة من السكروز (٥ , ١٠ ، ١٥ ٪).

٢- عقم الأنابيب ثم لقح مجموعة من تركيزات الملح بمزرعة من ميكروب *E. coli* والمجموعة الأخرى بمزرعة من ميكروب *B. subtilis* والمجموعة الثالثة تلقح بميكروب *Micrococcus* sp.

٣- كرر العمل مع تركيزات السكر بنفس الطريقة.

٤- حضن لمدة ٢٤ ساعة ثم إفحص المزارع وسجل درجة النمو لكل ميكروب فى جدول كالآتى :

إسم الميكروب	تركيز كلوريد الصوديوم (%)			تركيز السكروز (%)		
	٥	١٠	١٥	٥	١٠	١٥
B. subtilis						
E. coli						
Micrococcus sp						

تدريب (١٧) : تأثير تركيز أيون الأيدروجين على النمو الميكروبى

تتأثر البكتيريا بالتغيرات التى تحدث بدرجة الـpH فى بيئة النمو، ومن المعروف أن لكل ميكروب درجة pH يعطى عندها أكبر كمية من النمو وهى الدرجة المثالية ، والتدريب التالى يبين تأثير تغيرات درجة الـpH فى الوسط الغذائى على نمو البكتيريا.

الأدوات والمواد المطلوبة :

مجاميع من الأنابيب التى تحتوى على بيئة مرق الجلوكوز المغذي المعقمة وذات درجات حموضة مختلفة (٢ ، ٤ ، ٦ ، ٨ ، ١٠) - مزارع لميكروبات *E. coli* و *B. subtilis* و *Streptococcus* sp.

خطوات العمل :

١- لقح كل مجموعة من الأنابيب السابقة بميكروب من الميكروبات موضع الدراسة.

٢- حضن الأنابيب الملقحة على درجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

٣-لاحظ النمو من خلال وجود العكارة من عدمه

٤- سجل النتائج فى جدول كالآتى :

اسم الميكروب	تركيز أيون الأيدروجين				
	٢	٤	٦	٨	١٠
B. subtilis					
E. coli					
Streptococcus sp					

ثانياً : العوامل الكيميائية :

وهى عبارة عن العوامل التى تعتمد في تأثيرها على الميكروب على أسس كيماوية مثل تأثير المعادن الثقيلة والأصباغ وغيرها ، والتى تؤثر على نمو البكتيريا إما بالقتل أو التثبيط .

تدريب (١٨) : تأثير مضادات الحيوية على النمو الميكروبى

تعرف مضادات الحيوية على أنها المركبات الثانوية التـي تفرزهـا خلية الكائن الحى الدقيق والتى لهل تأثير مثـبط علـى نمـو الميكروبـات الأخرى. ومن الفطريات المنتجة للمضـادات الحيويـة فطـر البنسـيليوم Penicillium spp وفطـر الأسـبرجلس Aspergillus spp ومـن الأكتينوميستات جنس الإستربتوميسس مثل ميكـروب Streptomyces spp ومن البكتيريا *Bacillus subtilis* .

الأدوات والمواد المطلوبة :

أطباق بترى معقمة – أنبوبتين بكل منهما بيئة أجار مغذى معقمة – أقراص ورق ترشيح معقمة – ملقط – كحول – المواد الكيماويـة المـراد إختبـار تأثيرها على النمو البكتيرى أو مضاد حيوى كالبنسيلين – مزارع بكتيريـة لكل من *E. coli* و *B. Subtilis* و *Micrococcus* sp .

خطوات العمل :

١– سيح أنبوبتي الأجار المغذى وأتركها لتبرد حتى تصل لدرجـة حـرارة ٤٥°م .

٢– لقح الأولى من مزرعة *E. coli* والأخرى مـن مزرعـة *B. subtilis* والثالثة من مزرعة *Micrococcus* sp

٣– رج الأنابيب جيداً وصبها فى أطباق بترى وأتركها لتتصلب.

٤– عقم الملقط بالتلهيب الكحولى ثم إستخدمه فى وضع ستة أقـراص مـن ورق الترشيح المعقمة على مسافات منتظمة فى كل طبق على أن يكـون كل قرص مبلل بالمادة الكيماوية أو المضاد الحيوي المراد إختبار تـأثيره على النمو.

٥- حضن الأطباق الملقحة معتدلة بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

٦- لاحظ منطقة تثبيط النمو حول الأقراص inhibition zone خالية تماماً من النمو ويتناسب قطرها طردياً مع القوة القاتلة للمادة الكيماوية المختبرة.

تدريب (١٩) : تأثير مضاد الحيوية على النمو الميكروبى

الأدوات والمواد المطلوبة :

أنابيب بيئة أجار الجلوكوز معقمة – أطباق بترى معقمة – ماصات ١سم٣ معقمة – إبرة تلقيح – حمام مائى – أنابيب ماء معقم (٥سم٣ / أنبوبة) – حضان – مزارع سائلة لبكتيريا *Staphylococcus areus* – *E. coli* – مزارع صلبة لفطر *Penicillium notatum* – بيئة بويون مغذى .

خطوات العمل :

١- سيح أنابيب أجار الجلوكوز فى حمام مائى على ١٠٠°م ثم بردها إلى درجة حرارة ٥٠°م .

٢- خذ ١سم٣ من المزرعة السائلة ذات النمو الكثيف لبكتيريا *E. coli* أو *Staphylococcus areus* وأنقلها إلى طبق بترى تحت ظروف التعقيم .

٣- صب أنبوبة بيئة أجار الجلوكوز فى الطبق وحركه رحوياً بهدوء حتى تمام التجانس .

٤- أترك الطبق بحرارة الغرفة حتى يبرد .

٥- خذ بالإبرة بعد تعقيمها جزء من النمو الفطرى *Penicillium notatum* وضعها فى مركز الطبق وحضن على درجة ٣٠°م لمدة ٧ أيام .

٦- لاحظ الدائرة الشفافة حول المستعمرة الفطرية .

٧- إعمل شريحة لكل من البكتيريا والفطر وإفحصها ميكروسكوبياً .
٨- إرسم شكل النسيج الفطرى ولاحظ نظام خروج الجراثيم من الحوامل الجرثومية.
٩- إرسم شكل الخلايا البكتيرية موضحاً نظام التجمع مع الصبغة المستخدمة.

تدريب (٢٠) : تقدير معامل الفينول

لإختبار كفاءة مادة قاتلة يستخدم الفينول كمادة قياسية للمقارنة ، حيث تقارن كفاءة المادة المختبرة مع كفاءة الفينول تحت ظروف قياسية . وتسمى النسبة بين قوة المادة المختبرة وقوة الفينول على ميكروب معين بإسم معامل الفينول .

الأدوات والمواد المطلوبة :

أطباق بترى معقمة – أنابيب بها بيئة أجار مغذى معقمة – أقراص ورق ترشيح معقمة – ملقط – كحول – ماصة باستير – فينول ٥٪ – ديتول ٥٪ – كريزول ٥٪ – مزرعة بكتيرية من *E. coli* – *Bacillus* sp

خطوات العمل :

١- سيح أنابيب بيئة الأجار المغذى وأتركها لتبرد حتى تصل لدرجة حرارة ٤٥°م.
٢- لقح الأنابيب بغمسة إبرة من مزرعة *E. coli* أو مزرعة *Bacillus* sp ثم رج الأنابيب جيداً وصب كل أنبوبة فى طبق بترى وأتركها لتتصلب.
٣- ضع ستة أقراص ورق ترشيح بواسطة الملقط بعد تعقيمه بالتلهيب الكحولى على مسافات منتظمة فى كل طبق ، وبإستخدام ماصة باستير ضع نقطة أو نقطتين من الفينول على أقراص ورق الترشيح الموجودة فى الطبق الأول ، وكرر ذلك فى الطبق الثانى مستخدماً الديتول ، ثم فى الطبق الثالث مستخدماً الكريزول.

٤- كرر ذلك مع الأطباق الخاصة بميكروب *Bacillus* sp .

٥- حضن الأطباق الملقحة معتدلة بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

٦- إفحص كل طبق وقدر قطر منطقة التثبيط Inhibition zone باستخدام المسطرة ثم إحسب معامل الفينول ، ولاحظ أنه إذا كان ناتج القسمة أكبر من ١ يدل ذلك على أن المادة المستخدمة أكثر تأثيراً من الفينول ، أما إذا كان المعامل أقل من ١ فتكون المادة المختبرة أضعف من الفينول.

تدريب (٢١) : تأثير المعادن الثقيلة على النمو الميكروبى

هل يمكنك ملاحظة التأثير السام لمحاليل بعض المعادن الثقيلة Heavy metals على النمو البكتيري ؟ فإذا وضعت قطعة معدنية فى وسط طبق بترى يحتوى على بيئة بكتيرية مناسبة وملقحه بميكروب ما ، ثم تم التحضين على درجة حرارة مناسبة ولمدة مناسبة فسوف تلاحظ منطقة حول قطعة المعدن خالية تماماً من النمو تسمى منطقة التأثير الديناميكى للمعادن الثقيلة Oligodynamic zone، ثم يليها منطقة أخرى غزيرة النمو يطلق عليها منطقة التنشيط Stimulating zone حيث أن الآثار القليلة من المعادن الثقيلة تشجع النمو فى تلك المنطقة ، بينما يبدو النمو عادياً Normal grwth area فى باقى الطبق.

الأدوات والمواد المطلوبة :

عدد ٢ طبق بترى معقم - عدد ٢ أنبوبة بيئة أجار مغذى معقمة - أقراص من النحاس والفضة - كحول - ملقط - حامض نيتريك ١٠٪ - مزرعة بكتيرية من *B. subtilis* وأخرى لبكتريا *E. coli* .

خطوات العمل :

١- سيح أنبوبتين من بيئة الأجار المغذى وأتركها لتبرد حتى تصل لدرجة حرارة ٥٠°م ثم لقحها بغمسة إبرة من مزرعة *B. subtilis* ولقح الأنبوبة الأخرى بغمسة إبرة من مزرعة *E. coli* ورج الأنابيب جيداً ثم صب كل أنبوبة فى طبق بترى وأتركها لتتصلب.

٢- نظف الأقراص المعدنية وذلك بغمسها فى محلول حامض النيتريك ثم تخلص من أثار الحامض بالماء.

٣- عقم الملقط بالتلهيب الكحولى ثم ضع بواسطته قرص من النحاس فى وسط أحد الأطباق الملقحة وقرص من الفضة فى وسط طبق بترى أخر وذلك لكل ميكروب.

٤- حضن الأطباق الملقحة بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

٥- إفحص كل طبق وقدر قطر منطقة التأثير الديناميكى للمعدن موضع الدراسة بإستخدام المسطرة

٦- إرسم ما تشاهده موضحاً المناطق المختلفة المحيطة بالقرص المعدنى.

تدريب (٢٢) : تأثير الصبغات على النمو الميكروبى

توجد صبغات تؤثر على نمو البكتيريا الموجبة لجرام ولا تؤثر على البكتيريا السالبة لجرام مثل صبغة الكريستال البنفسجى وصبغة أخضر الملاكيت. والبكتيريا الموجبة لجرام حساسة دائماً لفعل التركيزات المنخفضة من هذه الصبغات ، ويفيد ذلك فى إيجاد بيئات إنتقائية تستخدم للتعرف على بعض أنواع البكتيريا مثل بكتيريا القولون ، وأيضاً فى علاج الإصابات الجلدية الناتجة من بعض البكتيريا الموجبة لصبغة جرام . والتدريب التالى يوضح تأثير بعض الصبغات على نمو البكتيريا الموجبة لجرام.

الأدوات والمواد المطلوبة :

صبغة كريستال بنفسجي تركيز ١٪ – عدد ٤ أنابيب بيئة أجار مغذى معقمة – أطباق بترى معقمة – مزرعة حديثة من كل مـــن *B. subtilis* و *E. Coli* و *Streptomyces* sp.

خطوات العمل :

١– إعمل سلسلة تخفيفات من محلول صبغة الكريستال البنفسجي (١٪) حتى تحصل على تخفيفات من الصبغة ١/١٠٠٠ ، ١/١٠٠٠٠ ، ١/١٠٠٠٠٠

٢– خصص لكل تخفيف من التخفيفات الثلاثة طبق بترى معقم وانقل إليـــه ١مل من التخفيف الخاص به.

٣– سيح بيئة الأجار المغذى وصب محتويات كل أنبوبة فى طبق ثم حـــرك الطبق حركة رحوية حتى يتم خلط البيئة بمحلول الصبغة خلطاً جيداً .

٤– بعد تصلب البيئة ، قسم قاع كل طبق إلى ثلاثة أقسام ثم لقح أحد قسمى الطبق بمزرعة من *B. subtilis* والقسم الأخر بـــ *E. coli* والقسم الثالث *Streptomyces* sp. وكرر عمليات التلقيح هذه بكل الأطباق المستعملة ثم حضن على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

٥– دون النتائج فى الجدول التالى مع وضع علامة (+ أو –) أمام كل تركيز لتشير إلى وجود النمو من عدمه.

إسم الميكروب	تركيز محلول صبغة الكريستال البنفسجي			
	بدون صبغة	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
B. subtilis				
E. coli				
Strepomyces sp.				

ثالثا : العوامل الحيوية :

التضاد الحيوي Antibiosis

يقصد بظاهرة التضاد الحيوي أن نمو ميكروب فى وسط ما يؤدى إلى إيقاف نمو ميكروب أخر أو إبادته . ومن الأسباب التى تؤدى إلى حدوث ظاهرة التضاد هو نمو أحد الميكروبات فى بيئة ما يؤدى إلى حدوث تغييرات بها تجعلها غير ملائمة لنمو الميكروب الأخر أو قد ينتج عن نشاط ميكروب ما إفراز مواد سامة تؤثر على نمو الميكروب الأخر . إستخدام أحد الميكروبات لمكونات البيئة بمعدل أسرع من الميكروب الآخر. كذلك قد ينتج عن التفاعلات الأيضية لأحد الميكروبات مواد كيماوية عضوية مثل مضادات الحيوية تؤثر على نمو الميكروب الآخر.

تدريب (٢٣) : ظاهرة التضاد

الأدوات والمواد المطلوبة :

بيئة أجار مغذى معقمة – أطباق بترى معقمة – ميكروبات منتجة لمضادات الحيوية مثل البنيسيليوم *Penicillium notatum* أو الإستربتوميسيس *Streptomyces grecians* ، وميكروب حساس للمضادات الحيوية مثل *E. coli* أو *Erwinia* sp.

خطوات العمل :

١– صب بيئة الأجار المغذى فى طبق بترى وأتركه يتصلب.

٢– لقح الطبق بالميكروب المنتج لمضادات الحيوية ثم على مسافة منه لقح الطبق بالميكروب الحساس للمضادات الحيوية مثل *E. coli* أو *Erwinia* sp.

٣– حضن على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

٤- إفحص الطبق ولاحظ أن الميكروب المنتج للمضاد الحيوي ينمو نمواً طبيعياً بينما الميكروب الآخر الحساس للمضاد الحيوي ينمو بعيداً عنه ويوجد بينهما منطقة خالية من النمو تسمى بمنطقة التضاد Inhibition zone نتيجة لإفراز مضادات الحيوية.

أسئلة:

١- عرف ما يلى :

أ- مضادات الحيوية Antibiotics

ب- درجة الحرارة المثلى Optimum temperature

ج- Oligodynamic action

د- Inhibition zone

٢- عرف كل من : Plasmolysis و Plasmoptysis

٣- تعيش الفطريات فى الوسط .... بينما تعيش البكتيريا فى الوسط ....

٤- اذا كان لديك مزرعة مختلطة من ميكروبى *E. coli* , *B. subtilis* فكيف يمكنك الحصول على كل ميكروب بمفرده بحالة منفرده .

٥- كيف تثبت إنتاج مضاد حيوي بواسطة ميكروب معين .

الدرس العملي الحادى عشر

حاجة البكتيريا للأكسجين

Oxygen Requirement for Bacteria

يهدف هذا الدرس إلى التعرف على علاقة الأكسجين الحر بنمو الميكروبات ، وكذلك يهدف إلى التدريب على طرق إنماء الميكروبات اللاهوائية ، فأنواع البكتيريا تختلف كثيراً فى إحتياجاتها للأكسجين الغازى ، فبعضها لايستطيع النمو فى غياب الأكسجين وتسمى هوائية إجباراً Strict aerobes، وبعضها لايستطيع النمو إلا فى غياب الأكسجين وتكون لاهوائية إجباراً Strict anaerobes فى حين ينمو البعض الآخر فى وجود وغياب الأكسجين وبذلك تكون لاهوائية إختياراً Facultative anaerobes وهناك بكتيريا محبة للهواء بنسبة قليلة وهى Microaerophiles إذ تحتاج للاكسجين الحر لكن بتركيز محدود للغاية . أما البكتيريا المتحملة للهواء aerotolerant فهى تلك البكتيريا اللاهوائية التى تتحمل وتستطيع النمو فى وجود نسبة من الأكسجين أقل من تلك الموجودة بالجو العادى .

أولاً : إختبار الإحتياج الأكسيجيني للبكتيريا

Examination of oxygen requirement for bacteria

يمكن تعيين نوع البكتيريا بالنسبة لحاجتها من الأكسجين بطريقتين هما طريقة الزرع بالإهتزاز Shake culture method وطريقة الزرع بالوخز Stab culture method .

تدريب رقم (٢٤) : طريقة المزرعة المهتزة

يجرى هذا التدريب بغرض إكساب الدارس مهارة تحديد حاجة البكتيريا للأكسجين بطريقة المزرعة المهتزة .

الأدوات والمواد المطلوبة :

أنابيب بيئة آجار الجلوكوز – مزرعة سائلة لكل من ميكروب *Serratia* sp. و *Lactobacillus* sp. و *Bacillus* sp. و *Clostridium* sp. – ماصـــة ١ سم^{٣} معقمة – جهاز رج أنابيب إختبار vortex .

خطوات العمل :

١- سيح أنابيب بيئة آجار الجلوكوز العميق على حمام مائي علـــى ١٠٠°م ثـــم بردها إلى ٤٥°م

٢- لقح البيئة بالميكروبات المراد إختبارها كل على حدى بواسطة ١/٢ سم^{٣} بماصة معقمة .

٣- هز الأنبوبة جيداً باستخدام جهاز الرج vortex لينشر الميكـــروب فـــي البيئة .

٤- ضع الأنبوبة في حامل واتركها لتتصلب .

٥- حضن المزرعة قائمة على ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة ، ولاحظ مكان نمـــو الميكروب بعد فترة التحضين هل هو على السطح فقط (ميكروب هـــوائي حتمي) أو في قاع البيئة فقط (ميكروب لاهوائي حتمـــي) ، أو اســـفل سطح البيئة بقليل (ميكروب محب لكمية قليلة من الأكسجين) ، أو النمو موزع في البيئة كلها (ميكروب لاهوائي إختياري).

٦- سجل ما تحصل عليه من نتائج في جدول كالآتي وارسم ما تشاهده .

إسم الميكروب	مكان النمو في الأنبوبة			
	سطحى	تحت السطح	منتشر	أسفل
Serratia sp.	+	-	-	-
Lactobacillus sp.	-	+	-	-
Bacillus sp.	-	-	+	-
Clostridium sp.	-	-	-	+

تدريب رقم (٢٥) : طريقة الوخز

يجرى هذا التدريب بغرض تنمية مهارة الدارس فى تحديد حاجة البكتيريا للأكسجين بطريقة الوخز .

الأدوات والمواد المطلوبة :

أنابيب بيئة آجار الجلوكوز – مزرعة سائلة لكل من ميكروب *Clostridium* sp. و *Bacillus* sp. و *Lactobacillus* sp. و *Serratia* sp.

– إبرة تلقيح مستقيمة .

خطوات العمل :

١– لقح بيئة آجار الجلوكوز بالميكروب المراد إختباره عن طريق وخز جزء من النمو الميكروبى على طرف إبرة التلقيح المستقيمة بطريقة الوخز .

٢– حضن المزرعة على ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة ، ثم لاحظ مكان النمو على طول خط الوخز وما إذا كان هذا النمو على الجزء السطحي من خط الوخز (ميكروب هوائي حتمي) ؛ أو في الجزء السفلي فقط من خط الوخز (ميكروب لاهوائي حتمي) . أو تحت السطح بقليل على خط الوخز (ميكروب محب لكمية قليلة من الأكسجين) ؛ أو على طول خط الوخز (ميكروب إختياري التهوية) .

٣- سجل ما تحصل عليه من نتائج في جدول كالآتى وارسم ما تشاهده .

إسم الميكروب	مكان النمو في الأنبوبة			
	سطحى	تحت السطح	منتشر	أسفل
Serratia sp.	+	-	-	-
Lactobacillus sp.	-	+	-	-
Bacillus sp.	-	-	+	-
Clostridium sp.	-	-	-	+

ثانياً : طرق تنمية البكتيريا اللاهوائية

تعتمد تنمية البكتيريا اللاهوائية إما علي توفير وسط خالى من الأكسجين ، أو علي إستهلاك الأكسجين الموجود فى الوسط الذى تنمو فيه البكتيريا وذلك بإستعمال طرق بيولوجية أو كيميائية خاصة سواء فى أطباق بترى أو فى أنابيب إختبار .

تدريب رقم (٢٦) تنمية البكتيريا اللاهوائية بطريقة البيروجالول

فكرة الإختبار :

تستخدم هذه الطريقة فى تنمية البكتيريا اللاهوائية فى أنابيب إختبار تحتوى على بيئات غذائية مائلة . وتعتمد الفكرة علي إمتصاص الأكسجين من جو البيئة بواسطة بيروجالات الصوديوم والناتجة من إتحاد الصودا الكاوية مع محلول حمض البيروجاليك وجعل الوسط حول البيئة خالياً من الأكسجين تماماً مما يسمح للميكروب اللاهوائي بالنمو .

الأدوات والمواد المطلوبة :

أنابيب بيئة أجار الجلوكوز ومستخلص الخميرة المائلة - مزرعة ميكروب لاهوائي *Clostridium sporogenes* وآخر هوائى *Serratia*

marcescens – محلول حمض البيروجاليك ٥٠٪ – محلول صودا كاوية ١٠٪ – ماصات ١ سم٣ – قطن ماص ومقص وسدادات كاوتشوك – ساق زجاجية .

خطوات العمل:

١- لقح بيئة الاجار المائل بالميكروب اللاهوائي بإبرة التلقيح ذات العقدة وآخر بالميكروب الهوائي .

٢- عقم فوهة انبوبة بيئة الأجار الملقحة ، وأعد السدادة القطنية لمكانها بعد التعقيم.

٣- قص الجزء القطني الخارج من فوهة الأنبوبة ، ثم عرض فوهة الأنبوبة للهب حيث يحترق جزء من السدادة ، وإدفع السدادة بقضيب زجاجي داخل الأنبوبة لمسافة تبعد عن سطح بيئة الأجار المائل حوالي ٢,٥ سم .

٤- ضع قطعة قطن ماص فوق السدادة التي تم دفعها داخل الأنبوبة ، وضع فوقها ٠,٥ سم٣ من محلول حامض البيروجاليك ، ثم أضف ٠,٥ سم٣ من محلول الصودا الكاوية وغطي الأنبوبة على الفور بسدادة كاوتشوك .

٥- إقلب الأنبوبة بسرعة لترتكز علي السدادة الكاوتشوك وحضن على ٣٠°م لمدة ٤-٥ أيام وتابع النمو بعد فترة التحضين .

تدريب رقم (٢٧) : تنمية البكتيريا اللاهوائية بطريقة الفاسبار

فكرة الإختبار:

تستخدم هذه الطريقة لتنمية البكتيريا اللاهوئية في أنابيب إختبار تحتوى على مزارع سائلة عن طريق حجب البيئة عن الوسط الخارجي بإستعمال الفاسبار بعد تلقيح البيئة بالميكروب اللاهوائي . وبعد ذلك تحضن البيئة علي درجة الحرارة المناسبة لمدة ١٥ يوم مع ملاحظة النمو يوميا .

الأدوات والمواد المطلوبة :

أنابيب بيئة بويون الجلوكوز المعقمة - فاسبار Vaspar (فـازلين + شـمع بـرافين بنسـبة ١:١) معقـم - الميكـروب اللاهـوائي *Clostridium sporogenes* - ميكروب هوائي مثل *Serratia marcescens* - حمام مائي - إبرة التلقيح ذات العقدة .

خطوات العمل :

١- إغلي بيئة بويون الجلوكوز فى حمام مائى على ١٠٠°م لمدة ١٥ دقيقـة لطرد الأكسجين المذاب فيها ثم بردها تبريداً فجائياً.

٢- لقح إحدى الأنابيب بالميكروب اللاهوائى وأخرى بالميكروب الهوائى .

٣- سيح الفاسبار المعقم ثم برده إلى ٥٠°م وصبه فوق سطح البيئة الملقحـة فى الأنبوبتين حتى يكون طبقة علي سطحها سمكها ١سم.

٤- حضن المزارع على درجة الحرارة المناسبة للمدة المطلوبـة ، حيـث يستدل علي النمو بعد فترة التحضين ، فإذا كان الميكروب من الميكروبـات المخمرة للجلوكوز فإنه سيكون غاز يدفع طبقة الفاسبار إلى أعلى مما يـدل علي نمو الميكروب.

٥- صف وارسم ما تشاهده .

٦- سجل إرتفاع المسافة التى تحركها طبقة الفاسبار باستخدام المسطرة .

تدريب رقم (٢٨) : تنمية البكتيريا الاهوائية باستخدام ميكروب هوائى

فكرة الإختبار:

تتخلص الطريقة في زراعة ميكروب لاهوائي علـي بيئـة أجـار الجلوكوز في طبق بترى بالتخطيط ، كما يزرع ميكروب هوائي بـالتخطيط علي طبق آخر وعلي نفس البيئة . يوضع الطبقين علي بعضهما مرتكـزين

علي الحواف ، ويحكم لصق الحافتين وذلك لحجز الهواء عن الداخل ، ثـم تحضن في الحضان علي الدرجة المطلوبة وللمدة المطلوبـة . يلاحـظ أن الميكروب الهوائي ينمو أولاً حتى يستهلك الأكسجين الموجود داخل الحيـز المغلق ثم يتوقف عن النمو ليعقبه الميكروب اللاهوائي فـي النمـو حيـث أصبحت الظروف مناسبة .

الأدوات والمواد المطلوبة :

أنابيب بيئة آجار جلوكوز مغذى عميق معقم –٢ طبق بترى معقم – ميكروب لاهـوائي *Clostridium sporogenes* – ميكـروب هـوائي *Serratia marcescens* .

خطوات العمل :

١- سيح أنابيب بيئة آجار الجلوكوز المغذى العميق علي حمام مائى علـى ١٠٠°م ثم بردها عند ٥٠°م .

٢- صب أنبوبة تحتوى على البيئة الغذائية فى كل طبق معقـم ثـم إتـرك الأطباق حتى تتصلب .

٣- لقح أحد الطبقين بالميكروب الهوائى والطبق الثاني بالميكروب اللاهوائى بطريقة التخطيط وتحت شروط التعقيم .

٤- ثبت حافتي الطبقين علي بعضهما بإحكام لمنع وصول الأكسـجين إلـى الداخل وذلك تحت شرط التعقيم .

٥- حضن الطبقين الملتصقين علي درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .

٦- صف وارسم ما تشاهده .

تدريب رقم (٢٩) : تنمية البكتيريا اللاهوائية بإستخدام طبق بروور

فكرة الإختبار:

طبق بروور Brewer dish يشبه طبق بترى العادى غير أن بغطائه بروز أو حافة داخلية تنطبق علي سطح البيئة التى توضع بقاعدة الطبق مما يؤدى إلى ترك حيز من الهواء فوق سطح هذه البيئة منفصلاً عن الجو الخارجي . ومع إستعمال بيئة تحتوي علي مادة تمتص الأكسجين من هذا الحيز فإنه يتوفر وسط لاهوائي يسمح بنمو البكتيريا اللاهوائية الملقحة بالطبق .

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزرعة ميكروب لاهوائي *Cl. sporogenes* – طبق بروور المعقم – أنبوبة بيئة أجار الثيوجليكولات المعقمة – حمام مائي – إبرة التلقيح ذات العقدة .

خطوات العمل :

١– سيح بيئة أجار الثيوجليكولات علي ١٠٠°م فى الحمام المائي ثم بردها إلى ٥٠°م وصبها في طبق بروور ثم إتركها لتتجمد .

٢– خطط بإبرة التلقيح المحملة بالميكروب اللاهوائي علي سطح البيئة .

٣– ضع غطاء الطبق مكانه لتلامس حافته الداخلية سطح البيئة تاركة حيزاً محجوزاً عن الجو الخارجي.

٤– ضع الطبق في الحضان علي درجة الحرارة المناسبة وللمدة المطلوبة.

٥– لاحظ النمو حيث يتم إمتصاص الأكسجين من المنطقة المحصور بها الهواء عن طريق مادة الثيوجليكولات الداخلة في تركيب البيئة وينتج عن ذلك وسطاً صالحاً لنمو البكتيريا غير الهوائية .

تدريب رقم (٣٠) : تنمية البكتيريا اللاهوائية بإستخدام طبق ماك لويد

فكرة الإختبار:

طبق ماك لويد Mc leod dish هو طبق بتري عادي إلا أن غطاءه من الزجاج وقاعدته من الخزف ومقسمة إلى قسمين كل منهما على شكل نصف دائرة . وتعتمد فكرة تنمية البكتيريا اللاهوائية باستعمال هذا الطبق على إستعمال مواد كيماوية من شأنها أيضاً إمتصاص الأكسجين من الطبق مع إحكام غلقه بمادة لاصقة تحول دون دخول الهواء إلى الداخل .

الأدوات والمواد المطلوبة :

مزرعة للميكروب اللاهوائي *Cl. sporogenes* – طبق ماك لويد المعقم – بيئة آجار الجلوكوز المغذي المعقمة – محلول حمض البيروجاليك ٥٠ ٪ – محلول الصودا الكاوية ٢٥ ٪ – حمام مائي – إبرة التلقيح ذات العقدة – مادة لاصقة .

خطوات العمل :

١– سيح بيئة آجار الجلوكوز ثم بردها إلى ٥٠°م وصبها في الغطاء الزجاجي لطبق ماك لويد وأتركها حتى تتصلب .

٢– لقح البيئة من مزرعة الميكروب اللاهوائي بطريقة التخطيط .

٣– ضع الغطاء الزجاجي فوق القاعدة الخزفية وذلك بعد أن تضع ١٠ سم^3 من محلول الصودا الكاوية ٢٥ ٪ في أحد نصفي الطبق و٤ سم^3 من محلول حمض البيروجاليك ٥٠٪ في النصف الآخر مع إحكام غلق الطبق بواسطة مادة لاصقة حتى لا يدخل الهواء الخارجي إلى داخل الطبق .

٤- إمسك الطبق بإحدى اليدين ، وحركه يميناً ويساراً بهدوء حتى تمتزج الصودا الكاوية مع حمض البيروجاليك وتتكون بيروجالات الصوديوم التى تمتص الأكسجين من جو الطبق لتوفر ظروفاً لاهوائية .

٥- ضع الطبق في الحضان على درجة الحرارة والمدة المطلوبة لنمو الميكروب ولاحظ النمو بعد فترة التحضين.

تدريب رقم (٣١) : تنمية البكتيريا اللاهوائية بإستخدام جهاز ماكنتوش وفيلدس Mc Intosh and Fieldes anaerobic Jar

فكرة الإختبار:

تعتبر هذه الطريقة من أفضل الطرق المستخدمة لزراعة الميكروبات اللاهوائية ويستعمل لذلك جهاز ماكنتوش وفيلدس ، وفيه يحل الهيدروجين محل الأكسجين الموجودة بالجهاز ثم تزال آثار الأكسجين الباقية باتحادها مع الهيدروجين على سطح سخان كهربائى ، وفي نفس الوقت يوضع مع الأنابيب والأطباق المحتوية على البيئة الملقحة بالميكروب اللاهوائي المراد تنميته أنبوبة تحتوي على دليل لاختبار وجود الأكسجين ، ثم يوضع الجهاز فى الحضان على درجة الحرارة الملائمة لنمو الميكروبات بعد التأكد من تمام إحلال الهيدروجين محل الأكسجين وذلك عندما يصبح دليل الأكسجين عديم اللون.

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزرعة الميكروب اللاهوائي - الأنابيب والأطباق المحتوية على البيئات المراد تنمية الميكروبات عليها - جهاز ماكنتوش وفيلدس - بطارية

كهربائية - إسطوانة هيدروجين - فازلين - أنبوبة تحتوي على دليل الأكسجين .

خطوات العمل :

١- سيح أنابيب البيئة الصلبة علي ١٠٠°م وبردها إلى ٥٠°م . ثم صبها في الأطباق ولقحها بالميكروب اللاهوائي بعد أن تبرد وتتجمد . أما إذا كانت البيئة سائلة فتغلى في حمام مائي علي ١٠٠°م لمدة ١٠ دقائق لطرد الهواء ثم تلقح بعد تبريدها.

٢- ضع الأنابيب والأطباق وأنبوبة دليل الأكسجين في وعاء الجهاز.

٣- غطى الجهاز بعد وضع الفازلين على حافته ثم أحكم قفل الغطاء بالمسمار اللولبى.

٤- مرر غاز الهيدروجين إلى وعاء الجهاز من إسطوانة الهيدروجين خلال صنبور تمرير الهيدروجين وإستمر فى تمرير الغاز لمدة كافية ثم أقفل الصنبور.

٥- وصل السخان بالكهرباء حتى تتكون شرارة كهربائية تساعد على إتحاد الهيدروجين ببقايا الأكسجين الموجودة بالوعاء فتتكون قطرات مائية على جدار الوعاء مما يدل على خلو الجهاز من الأكسجين مع ملاحظة إختزال لون دليل الأكسجين.

٦- ضع الجهاز في الحضان على درجة الحرارة والمدة المطلوبة ولاحظ نمو الميكروبات بعد إنتهاء فترة التحضين .

أسئلة :

١- إلى ماذا تعزو نمو البكتيريا اللاهوائية في طريقة البيروجالول ؟

٢- أذكر الإسم العلمي لميكروبات لا ينجح معها إختبار الفاسبار.

٣- ما هو الأساس النظري الذي تعتمد عليه فكرة تنمية البكتيريا اللاهوائية بإستخدام طبق بروور ؟

٤- ما هى فكرة إستخدام جهاز ماكنتوش وفيلدس لتنمية البكتيريا اللاهوائية ؟

٥- أذكر طريقة لتنمية البكتيريا اللاهوائية فى أطباق واخري فــى مــزارع صلبة مائلة وثالثة فى مزارع سائلة.

الدرس العملى الثانى عشر

النشاط الإنزيمى للبكتيريا

Enzymatic Activities of Bacteria

يستهدف هذا الدرس التعرف على بعض النظم الإنزيمة التى تمتلكها الكائنات الحية الدقيقة والتى يمكن عن طريقها التعرف على الميكروبات وتمييزها عن بعضها البعض. وفيما يلى أمثلة لبعض الإنزيمات المميزة للبكتيريا الموجودة بالأوساط المختلفة الموجودة حولنا .

تدريب رقم (٣٢) : التحليل المائى للنشا Starch hydrolysis

من المعرف أن جزئ النشا عبارة عن وحدات من الجلوكوز α-glucose ترتبط مع بعضها في سلسلة مستقيمة أو متفرعة برابطة جليكوسيدية . ونظراً لكبر حجم جزئ النشا ولعدم قابليته للذوبان في الماء فإن البكتيريا لا تستطيع إستخدامه ، وهناك من الميكروبات مالها القدرة على إفراز إنزيمات الأميليز amylase (الدياستيز) التي تحلل جزئ النشا إلى نواتج مثل الدكسترينات ، والمالتوز ، والجلوكوز . وتستخدم قدرة الميكروبات على تحليل النشا فى تعريفها وتفريقها عن غيرها من الميكروبات . ويهدف هذا التدريب إلى الكشف عن تحليل النشا ميكروبياً للتمييز بين الميكروبات المحللة وغير المحللة له .

الأدوات والمواد المطلوبة :

مزارع بكتيرية – أطباق بترى معقمة – أنابيب آجار النشا العميق – محلول اليود – ميكروب *E. coli* – ميكروب *Bacillus subtilis*

طريقة العمل :

١- سيح أنابيب آجار النشا العميق في حمام مائى ، ثم برد إلى ٤٥°م ، وصب محتويات كل أنبوبة في طبق بترى معقم ، ثم حرك كل طبق حركة رحوية هادئة لإنتظام توزيع البيئة بالطبق ، واترك البيئة لتبرد وتتجمد.

٢- لقح أحد الأطباق بغمسة إبرة من المزرعة المختبرة فى وسط الطبـــق ، ولقح طبق آخر بنفس الطريقة من مزرعة أخرى ، وهكذا.

٣- حضن الأطباق مقلوبة على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

٤- بعد إنتهاء مدة التحضين إغمر الأطباق بمحلول اليود (كشاف).

٥- لاحظ تكون هالة رائقة عديمة اللون نتيجة تحليل النشا حول مســـتعمرة الميكروب المحلل للنشا بينما بقية البيئة تظهر بلـــون أزرق . لاحـــظ أن الدكسترينات والمالتوز والجلوكوز لا تعطى التفاعل اللونى مع اليود . أما فى حالة الميكروب غير المحلل للنشا فإن اللون الأزرق يسود كل البيئة.

تدريب رقم (٣٣) : التحليل المائى للكازين Casein hydrolysis

من المعروف أن الكازين هو المكون البروتيني الأساسى فـــى اللـــبن ، وهو عبارة عن فوسفوبروتين . ويوجد الكازين فى اللبن كمعلق غروى يعطـــى للبن اللون الأبيض غير الشفاف . وتقوم بعض الميكروبات بتحليل الكـــازين – من خلال عملية تسمى الببتنة peptonization إلى مشتقات قابلة للذوبان وأكثـــر شفافية من الكازين ، ويتم ذلك بإفرازها للإنزيمات المحللة للكازين Caseinase. ويفيد التعرف على قدرة ميكروب ما على تحليل الكـــازين فـــى تعريـــف هـــذا الميكروب وتميزه عن غيره من الميكروبات .

الأدوات والمواد المطلوبة :

مزارع بكتيرية - أطباق بتري معقمة - أنابيب آجار مغذى عميق - لبن فرز (خض) معقم - ماصات ١سم٣ معقمة - محلول HCl ١٠٪.

خطوات العمل :

١- سيح أنابيب الآجار المغذى العميق ثم بردها إلى ٤٥°م.

٢- ضع ١سم٣ من اللبن الفرز المعقم بإستخدام ماصة معقمة في كل طبق من أطباق بتري.

٣- صب أنبوبة آجار مغذى فى كل طبق وحرك الطبق رحرياً بهدوء حتى ينتشر اللبن الفرز في الآجار المغذى بإنتظام.

٤- أترك البيئة تتجمد ثم لقح بالتخطيط كل طبق بأحد الميكروبات المختبرة.

٥- حضن الأطباق مقلوبة على ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة .

٦- إختبر الأطباق لوجود منطقة رائقة clear zone حول النمو الميكروبي.

٧- أغمر الأطباق بمحلول HCl تركيز ١٠٪ فإذا ظلت المنطقة الرائقة موجودة وزادت وضوحاً فالنتيجة موجبة . وإذا لم تكن المنطقة موجودة أى غير واضحة للعين وظهرت وزادت وضوحاً بعد إضافة محلول الحامض فالنتيجة موجبة أيضاً أما عدم وجود المنطقة الرائقة قبل أو بعد إضافة الحامض تعتبر النتيجة سالبة .

تدريب رقم (٣٤) : إسالة للجيلاتين Gelatin liquefaction

من المعروف أن الجيلاتين هو عبارة عن مادة بروتينية صعبة التحلل، تحضر من الكولاجين Collagen وهو أحد مكونات النسيج الضام والأوتار فى جسم الحيوانات . وبتحلل الجيلاتين يفقد قدرته على التصلب ويصبح سائلاً . وممكن أن يتم هذا بواسطة إنزيم الجيلاتينيز gelatinase

الذى تفرزه كثير من الميكروبات خارج خلاياها . وفي العادة يعتبر الميكروب المحلل للجيلاتين محلل للبروتين proteolytic وعموماً يفيد إختبار تحليل الجيلاتين فى تعريف الميكروبات .

الأدوات والمواد المطلوبة :

مزارع بكتيرية – أنابيب بيئة الجيلاتين المغذى العميق

خطوات العمل :

١- لقح بالوخز أنابيب محتوية على بيئة الجيلاتين المغذى العميق بالمزارع المختبرة كل على حدى ، مع ترك واحدة بدون تلقيح للمقارنة .

٢- حضن الأنابيب على ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

٣- إنقل الأنابيب إلى الثلاجة أو ضعها فى كأس به ماء مثلج لمدة ساعة وإختبر لإسالة الجيلاتين.

٤- لاحظ أن تجمد الجيلاتين يدل على عدم قدرة الميكروب على تحليله بينما إسالته تثبت العكس ، مع ملاحظة أن بيئة الجيلاتين المغذى فى الحالة الطبيعية سائلة hydrosol على ٢٥°م وصلبة hydrogel على درجة أقل من ٢٥°م.

تدريب (٣٥) : التحليل المائى للدهون Lipids hydrolysis

تستطيع بعض الميكروبات تحليل الدهون مثل الجليسريدات الثلاثية triglycerides إلى أحماض دهنية وجليسرول ، وذلك لإفرازها إنزيم الليبيز lipase خارج خلاياها . وينتج عن ذلك تزنخ الزيوت والدهون وفسادها حيث يؤدى تكون الأحماض الدهنية إلى ظهور طعم ورائحة التزنخ . ولذلك يجب العمل على تجنب وجود مثل هذه الميكروبات فى المواد الدهنية

المحفوظة بأختلاف أنواعها . ويهدف هذا التدريب إلى التعرف على بعض الميكروبات وتشخيصها من خلال قدرتها على تحليل الدهون من عدمه.

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزارع بكتيرية - زيت بذرة قطن معقم أو زبد معقم سايح - أطباق بترى معقمة - ماصات معقمة - أنابيب آجار مغذى عميق - محلول كبريتات نحاس .

خطوات العمل :

١- سيح أنابيب الآجار المغذى العميق فى حمام مائي ثم برد إلى ٤٥°م .
٢- ضع فى كل أنبوبة ١ سم^3 من زيت بذرة القطن المعقم (أو الزبد المعقم) ورج جيداً حتى يتكون مستحلب ، وصب محتويات كل أنبوبة في طبق بترى معقم وحركه حركة رحوية لتوزيع البيئة بإنتظام ثم اتركه يبرد لتتجمد البيئة.
٣- لقح كل طبق بأحد الميكروبات موضع الإختبار.
٤- حضن الأطباق مقلوبة على ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .
٥- بعد إنتهاء مدة التحضين أغمر الأطباق بمحلول كبريتات النحاس .
٦- لاحظ وجود لون أخضر مزرق Bluish green حول المجاميع المحللة للدهون نتيجة تفاعل كبريتات النحاس مع الأحماض الدهنية الناتجة عن تحليل الميكروب للدهن .

التحليل المائى للسليلوز Cellulose hydrolysis

جزئ السليلوز عبارة عن وحدات عديدة من الجلوكوز (β-glucose). وعند إرتباط وحدتين من سكر الجلوكوز يتكون سكر السلوبيوز cellobiose، ثم بارتباط وحدات سكر السلوبيوز معاً يتكون جزئ السليلوز . وتحلل بعض

الميكروبات السليلوز فى خطوتين ، أولاً إلى سلوبيوز ، وثانياً إلى الجلوكوز طبقاً للمعادلة الآتية: سليلوز ← سلوبيوز ← ٢وحدة جلوكوز .

وتقسم الميكروبات المحللة للسليلوز إلى ميكروبات هوائية Aerobes وهى تحلل السليلوز إلى جلوكوز ثم CO_2 وH_2O وأنشطها ميكروب *Cytophaga* sp. المتواجد بالتربة الزراعية بكثرة . وميكروبات لا هوائية Anaerobes وهى تحلل السليلوز إلى أحماض عضوية وCO_2 وH_2O وCH_4 والموجودة فى روث الحيوانات بكثرة ومن أمثلتها ميكروب *Cl. Dissolvans*

ويهدف هذا التدريب إلى التعرف على البكتيريا من حيث قدرتها على تحليل السليلوز من عدمه تحت الظروف الهوائية أو اللاهوائية.

تدريب (٣٦) : التحليل المائى للسليلوز هوائياً

الأدوات والمواد المطلوبة :

بيئة دوبس Dubos cellulose medium المعقمة فى أنابيب إختبار وهى تتكون من أملاح معدنية لازمة للنمو وشرائط من ورق الترشيح كمصدر للكربون – عينة تربة زراعية خصبة غنية بالمواد العضوية.

خطوات العمل :

١- لقح أنابيب بيئة دوبس بعينة التربة الموجودة أمامك.

٢- حضن على ٢٨- ٣٠°م لمدة شهر.

٣- إفحص الأنابيب أسبوعياً .

٤- لاحظ ظهور تآكل shot holes or disentigration أو بقع صفراء أو بنية بشريط ورق الترشيح في حالة الميكروبات الهوائية المحللة للسليلوز.

تدريب (٣٧) : التحليل المائى للسليلوز لا هوائياً

الأدوات والمواد المطلوبة:

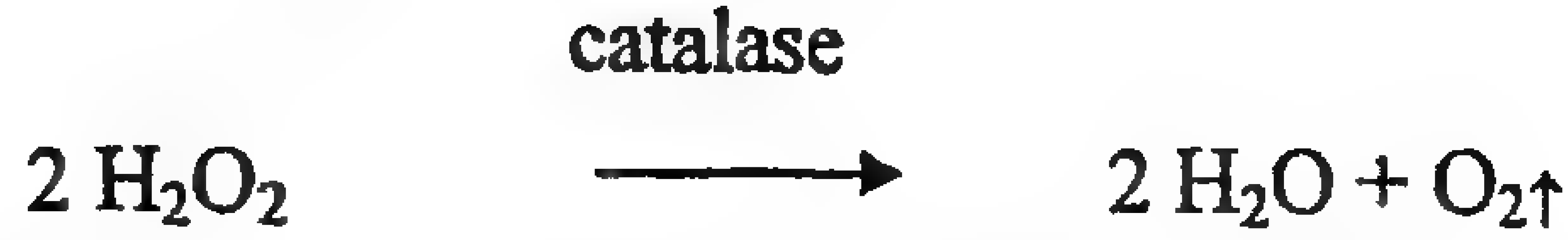
بيئة أوملیانسکی Omeliansky's cellulose medium المعقمة فى أنابيب إختبار وهى تتكون من أملاح معدنية لازمة للنمو وشرائط من ورق الترشيح كمصدر للكربون مغمورة فى البيئة – عينة من سماد الإسطبل – فاسبار معقم .

خطوات العمل :

١- لقح أنابيب بيئة أومليانسكى بعينة من سماد الإسطبل.
٢- ضع كمية قليلة من الفاسبار المعقم السايح على سطح البيئة الملقحة تحت شروط التعقيم لجعل الظروف لاهوائية.
٣- أترك الأنابيب في جو المعمل.
٤- إفحص الأنابيب أسبوعيا لملاحظة ظهور تآكل Shot holes or disentigration في أجزاء ورقة الترشيح أو بقع صفراء أو بنية في حالة الميكروبات اللاهوائية المحللة للسليلوز مع إندفاع طبقة الفاسبار لأعلى نتيجة تكون غازات من تحليل السليلوز تحت هذه الظروف . كذلك يفيد هذا الإختبار فى المقارنة بين القدرة التخمرية للميكروبات المختلفة من خلال قياس طول عمود الغاز الناتج نتيجة رفع طبقة الفاسبار لأعلى .

تدريب (٣٨) : الكشف عن إنزيم الكاتاليز Catalase test

تحتوى الميكروبات الهوائية على إنزيم الكاتاليز ، وهو أحد إنزيمات التنفس، والذي يحفز تفاعل تحلل فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 مع تحرير وإنفراد الأكسجين ، كما فى التفاعل التالى



$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2\,H_2O + O_2\uparrow$$

أما الميكروبات السالبة للكاتاليز فإنها تكون لاهوائية . ولذلك يهدف هذا التدريب إلى التعرف على إمتلاك الميكروبات للكاتاليز من عدمه .

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزارع آجار مائلة للميكروبات موضع الدراسة بعمر ٢٤-٤٨ ساعة - محلول ٣٪ H_2O_2 .

خطوات العمل :

١- أضف بضع نقط من محلول H_2O_2 إلى المزارع المائلة.

٢- لاحظ تصاعد غاز الأكسجين بسهولة كفقاعات شفافة في حالة الميكروبات الموجبة وهى تتشبه الفقاعات التى تخرج من المياه الغازية عند وضعها فى الكوب .

تدريب (٣٩) : الكشف عن إنزيم الأكسيديز Oxidase test

تستطيع بعض الميكروبات أكسدة بعض الأمينات العطرية مثل مركب P-aminodimethylaniline حيث تكون نواتج نهائية ملونة . وتعتمد عملية الأكسدة هذه على نشاط إنزيم السيتوكروم أكسيديز في هذه الميكروبات . ويفيد إختبار الأكسيديز فى تمييز البكتيريا المعوية عائلة *Enterobacteriaceae* والتى تتميز بصفة خاصة بأنها سالبة لإختبار الأكسيديز ، وكذلك يفيد فى عملية تعريف البكتيريا بصفة عامة.

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزارع بكتيرية مائلة - شرائط مغمورة فى دليل إختبار الأكسيديز.

خطوات العمل :

١- إنقل بإبرة تلقيح معقمة جزء من النمو من المزرعة المختبرة ، ثم إنشر جيداً مع الضغط على جزء من شريط الإختبار.

٢- بعد نحو نصف دقيقة سجل التغير فى اللون.

٣- لاحظ ظهور لون بنفسجى مزرق Bluish violet دليلاً على أن النتيجة موجبة.

أسئلة:

١- ما هو الإنزيم المسئول عن تحليل الكازين ؟

٢- ما هى نواتج تحلل الكازين إنزيمياً؟

٣- أذكر أمثلة لأسماء علمية لميكروبات تعطى نتيجة موجبة وأخرى تعطى نتيجة سالبة مع جميع الإختبارات المذكورة فى هذا الدرس العملى.

٤- كيف تكشف عن أفراد عائلة *Enterobacteriaceae* بإختبار واحد سريع.

٥- وضح كيفية الكشف عن تحليل السليلوز هوائى ولاهوائى فى أنابيب إختبار .

الدرس العملى الثالث عشر

تمييز البكتيريا

Bacterial Differentiation

تتعدد وتتنوع الجناس والأنواع البكتيريا الموجودة فى البيئات الغذائية والأوساط المختلفة بالبيئة المحيطة بالإنسان ويتميز كل نوع منها بخصائص مورفولوجية وفسيولوجية ومزرعية تجعله مختلفاً تماماً عن الأنواع الأخرى. وعند محاولة التعرف على أى نوع من هذه الأنواع لابد من إجراء مجموعة من الإختبارات التمييزية مثل صبغ البكتيريا بطرق الصبغ المختلفة ، وقياس أحجامها ودراسة قدرتها على الحركة وكذلك دراسة العوامل التى تؤثر على نموها ، بالإضافة إلى دراسة النشاط الإنزيمى لها. وفيما يلى سوف نناقش هذه الإختبارات بشئ من التفصيل.

صبغ البكتيريا Bacterial staining

تختلف البكتيريا عن الأحياء الدقيقة الأخرى فى أنها شفافة وأصغر حجماً ولذلك يتطلب فحصها ضرورة تهيئة أنسب الظروف لرؤيتها ميكروسكوبيا . ويعنى هذا أن يكون الميكروسكوب نظيفاً ، وفى حالة جيدة ، والإضاءة مناسبة ، وأن تكون التحضيرات البكتيرية للفحص الميكروسكوبى مجهزة بدقة . ومن المعروف أن الخلايا البكتيرية خلايا شفافة لإحتوائها على نسبة عالية من الماء لذا يصعب فحصها وإختبارها وتمييزها إلا بعد صبغها بصبغات خاصة وعلى صورة أغشية مثبتة .

لذلك يهدف هذا الدرس إلى تنمية قدرة الدارس على التعامل مع طرق الصبغ المختلفة للبكتيريا حتى يسهل عليه التعرف على أشكالها المختلفة ونظم تجمعها كإحدى الطرق الهامة فى التعرف على الأجناس والأنواع البكتيرية المختلفة.

الصبغة :

الصبغة هى عبارة عن مركبات عضوية تحتوى على شقين أحدهما منتج للون والآخر مثبت له . ويمكن تقسيمها إلى مجموعتين الأولى منها صبغات حامضية والتى فيها يسلك الجزء المنتج للون من الصبغة مسلك الأنيونات فيشار إليها على أنها صبغات حامضية مثل صبغة النيجروسين، وتستعمل فى صبغ السيتوبلازم الخلوى . بينما الثانية هى صبغات قاعدية حيث يسلك الجزء المنتج للون من الصبغة مسلك الكاتيونات فتكون بذلك صبغات قاعدية مثل معظم الصبغات المستخدمة فى المعمل مثل صبغة الفوكسين وأزرق الميثيلين والجنسيان البنفسجى (الكريستال) وأخضر الملاكيت ، وتستعمل فى صبغ الحبيبات والمركبات الحامضية بالخلية .

الصبغ:

هناك عدة نظريات تفسر على أساسها حدوث عملية الصبغ منها ما يستند إلى أسس فيزيائية ومنها ما يفسر على أسس كيماوية كالآتى :

١ - النظرية الفيزيائية:

تفسر هذه النظرية عملية الصبغ على أنها تحدث نتيجة الخاصية الشعرية أو القوى الإسموزية أو الإدمصاص أو الإمتصاص، دون أن يتكون مركب كيمائي جديد . وبالتالى يمكن بسهولة إسترجاع كل الصبغة تقريباً من الخلايا البكتيرية المصبوغة عقب غمرها لمدة طويلة فى الماء أو الكحول أو فى المذيبات الأخرى.

٢- النظرية الكيميائية:

تفسر هذه النظرية عملية الصبغ على أساس كيميائي بحت ، حيث تتفاعل الصبغات الحمضية مع المكونات القاعدية بالخلية (السيتوبلازم) ، والصبغات القاعدية تتفاعل مع المكونات الحمضية بالخلية (الأحماض النووية) ، وعلى هذا يمكن القول بأنه يحدث تفاعل كيميائي بين الصبغة ومكونات الخلية البكتيرية فيتكون مركب جديد له صفات طبيعية وكيميائية مختلفة عن المكونات الأصلية المشتركة في التفاعل ، وبالتالي لا يمكن إسترجاع الصبغة بواسطة الماء أو المذيبات.

٣- النظرية الفيزيائية الكيميائية:

لا تتم عملية الصبغ بالبساطة السابق ذكرها وربما لا تفسر النظريات السابقة عملية الصبغ ، ولكن قد يكون صبغ الخلايا البكتيرية عبارة عن عملية فزيائية وكيميائية تحدث في نفس الوقت.

أنواع الصبغ :

يمكن تقسيم الصبغات إلى نوعين حسب قدرتها على تخلل جدار الخلية من عدمه وهما الصبغ الموجب وفيه تستطيع الصبغة التخلل خلال جدر الخلايا البكتيرية وذلك نظراً لصغر حجم جزيئاتها وإكسابها اللون الخاص بها. والصبغ السالب وفيه يتم صبغ الوسط دون الخلية حيث لا تستطيع جزيئات الصبغة تخلل الجدار الخلوى للبكتيريا وذلك لكبر حجم جزيئاتها ويستخدم هذا النوع من الصبغ عند الرغبة في قياس حجم البكتيريا حيث تكون الخلية البكتيرية بحجمها الطبيعي .

طرق الصبغ :

تقسم طرق الصبغ على حسب عـدد الصـبغات المسـتخدمة إلـى طريقتين الأولى هو الصبغ البسيط وفيه يستعمل نوع واحد مـن الصـبغات تعطى الميكروب اللون الخاص بها والثانى هو الصبغ المركب (المزدوج أو التفريقي) وفيه يستخدم نوعين أو أكثر من الصبغات مثل الصـبغ بطريقـة جرام ، صبغ الجراثيم البكتيرية ، صـبغ البكتيريـا الصـامدة (المقاومـة) للأحماض وكذلك صبغ الغلاف البكتيرى .

وتنحصر خطوات الفحص الميكروسكوبى للخلايا البكتيرية فى تحضير غشاء من البكتيريا قيد الدراسة وتثبيته ، صبغ الغشاء وتجفيفـه وأخيـراً فحـص الغشاء باستعمال العدسة الزيتية المنغمسة .

تدريب رقم (٤٠) : تحضير الغشاء البكتيرى وتثبيته

Preparation and fixation of bacterial smear

الأدوات والمواد المطلوبة :

لهب بنزن – إبرة التلقيح ذات العقدة – ماء معقـم – مزرعـة بكتيريـة – شريحة زجاجية – حامل الإبرة – ميكروسكوب ضوئى – زيـت سـيدر – زيلول لتنظيف عدسات الميكروسكوب قبل الإستعمال وبعده – صبغات.

خطوات العمل :

١- نظف شريحة زجاجية جيداً ومررها على اللهب عـدة مـرات للتعقـيم الجزئى وللتخلص من آثار ما قد يكون عالقاً بها من حبيبات دهنية ، ثـم ضع الشريحة على حامل الشرائح لتبرد.

٢- عقم إبرة التلقيح ذات العقدة بوضع السلك على اللهب بميل رأسـياً إلـى درجة الإحمرار ثم مرر يد الإبرة فى اللهب مع إدارتها ثلاث مرات.

٣- بعقدة الإبرة المعقمة خذ نقطة ماء معقم وضعها بوسط الشريحة.

٤- إمسك المزرعة البكتيرية المائلة من أسفل باليد اليسرى فى وضع مائل بحيث يظهر النمو البكتيرى إلى أعلى . وباليد اليمنى عقم إبرة التلقيح كما سبق وبواسطة الأصبع الصغير لليد اليمنى إنزع الغطاء القطنى للأنبوبة مع مراعاة عدم ملامسته لأى سطح خارجى ثم مرر فوهة المزرعة فى اللهب مرتين وخذ جزء صغير من النمو البكتيرى على طرف الإبرة السابق تعقيمها مع الحذر من خدش المزرعة . بعد ذلك يعاد تمرير فوهة الأنبوبة على اللهب ثانية وتعاد السدادة القطنية مكانها وتوضع الأنبوبة فى حاملها الخاص بها.

٥- إمزج جيداً النمو البكتيرى العالق بطرف الإبرة بنقطة الماء الموجودة على الشريحة ثم وزع المعلق المتكون على مساحة مناسبة تسمح بظهور الغشاء رقيقا.

٦- عقم الإبرة كالمعتاد وضعها على حاملها مع ملاحظة أن تعقيم الإبرة قبل وبعد الإستعمال أمراً لابد منه .

٧- جفف التحضير بتعريض الشريحة أعلى اللهب على مسافة مناسبة بحيث يكون الغشاء المحضر إلى أعلى .

٨- ثبت الغشاء وذلك لضمان عدم زواله فى الخطوات التالية ، ويتم ذلك بتمرير الشريحة على اللهب ثلاث مرات بحيث يكون الغشاء على السطح العلوى ثم توضع الشريحة على الحامل وتترك حتى تبرد .

صبغ الغشاء Staining of smear

١- بعد تحضير الغشاء وتثبيته كما سبق شرحه توضع الشريحة على حامل الصبغات وتصبغ بالطريقة المطلوب إستعمالها والتى سيأتى وصف كل منها فى التمارين التالية .

٢- بعد ذلك يتم التخلص من الزائد من الصبغة الموجودة على الشريحة فى الحوض المعد لذلك ثم يتم غسل الغشاء من الصبغة بإحتراس بتيار هادئ من الماء حتى يصير ماء الغسيل رائقاً . ثم تجفف الشريحة بوضعها بين ورقتى نشاف ثم أعلى اللهب على مسافة مناسبة .

تدريب رقم (٤١) : فحص الغشاء البكتيرى باستعمال العدسة الزيتية المنغمسة

١- نظف أجزاء الميكروسكوب خاصة الأجزاء البصرية ثم إضبط الضوء الداخل إلى الميكرَوسكوب بالإستعانة بالمرآة والمكثف والحجاب حتى ترى المجال الميكروسكوبى مضاءاً إضاءة كاملة ومنتظمة فى جميع أجزائه.

٢- ضع الشريحة على مسرح الميكروسكوب وثبت بالمقابض , وضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء , وحرك القطعة الأنفية لجعل العدسة الزيتية على إستقامة أنبوبة جسم الميكروسكوب.

٣- إغمس العدسة الزيتية فى نقطة الزيت حتى تلامس الشريحة برفق وذلك باستعمال المعدل التقريبى Coars adjustment ويجرى ذلك والعين فى مستوى المسرح مع الحذر الشديد من نزول العدسة أكثر من ذلك وإلا كسرت الشريحة وحدث خدش للعدسة.

٤- إنظر خلال العينية وبواسطة المعدل التقريبى إرفع أنبوبة الميكروسكوب إلى أعلى ببطء حتى ترى لون الصبغة عند ذلك إستعمل المعدل الدقيق Fine adjustment حتى ترى خلايا البكتيريا بوضوح.

الدرس العملى الرابع عشر

الصبغ البسيط

Simple Staining

يستعمل الصبغ البسيط للتعرف على شكل خلايا الميكروب ونظام تجمعه. والصبغات الشائعة الإستعمال هى صبغة الفوكسين المخفف Diluted fuchsin أو السفرانين Safranin وهى من مشتقات الإنيلين ولونها أحمر, ومدة التعرض لها دقيقة واحدة. وصبغة أزرق الميثيلين Methylene blue وهى صبغة ضعيفة نسبياً ومدة التعرض لها ٥ دقائق .

تدريب رقم (٤٢) : صبغ البكتيريا بالفوكسين أو السفرانين

الأدوات والمواد المطلوبة :

مزارع مائلة عمرها ٢٤ ساعة من *Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Streptomyces albus, Pseudomonas flurescens,* – الفوكسين المخفف أو السفرانين – شرائح نظيفة – حوض الصبغ – ورق نشاف .

خطوات العمل:

١- جهز غشاء من كل من المزارع المذكورة وثبته بالحرارة كما سبق شرحه وإتركه ليبرد.

٢- إصبغ الغشاء بوضع قليل من صبغة الفوكسين المخفف او صبغة السفرانين علي الغشاء البكتيرى وإترك الشريحة لمدة دقيقة واحدة .

٣- تخلص من الزائد من الصبغة بصبها فى حوض الصبغ ثم إغسل الشريحة بإحتراس شديد بتيار هادئ من الماء .

٤- جفف الشريحة بين ورقتى نشاف نظيف , ثم أعلى اللهب علـــى مســـافة مناسبة عدة مرات .

٥- ضع نقطة من زيت السيدر على الغشـــاء ثـــم إفحصــــه ميكروســــكوبياً مستعملاً العدسة الزيتية المنغمسة .

٦- صف وإرسم ما تشاهده ولاحظ شكل الخلايا ونظام التجمع ثـــم أكتـــب البيانات فى الجدول التالى .

	الاسم العلمى للميكروب	اسم الصبغة المستخدمة	لون الصبغة المستخدمة	اللون النهائى للميكروب	شكل خلية الميكروب	نظام تجمع الميكروب	الرسم
١							
٢							
٣							
٤							
٥							

تدريب رقم (٤٣) : صبغ البكتيريا بأزرق الميثيلين

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزرعة مائلة من الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* عمرها ٢٤ ساعة – أزرق الميثيلين – شرائح زجاجية نظيفة – لهب بنزن – إبرة التلقيح ذات العقدة .

خطوات العمل :

١- جهز غشاء من مزرعة الخميرة وثبته وجففه كالمعتاد.

٢- إصبغ الغشاء بصبغة أزرق الميثيلين بوضع قليل من الصبغة على الغشاء لمدة ٥ دقائق , ثم تخلص من الزائد من الصبغة وإغسل الشريحة بالماء وجففها كما سبق.

٣- ضع على التحضير نقطة من زيت السيدر وإفحص مستعملاً العدسة الزيتية المنغمسة كما سبق إيضاحه .

٤- صف وإرسم ما تشاهده ، لاحظ شكل الخلايا ونظام التجمع ثم أكتب البيانات في الجدول التالي .

	الاسم العلمي للميكروب	اسم الصبغة المستخدمة	لون الصبغة المستخدمة	اللون النهائي للميكروب	شكل خلية الميكروب	نظام تجمع الميكروب	الرسم
١							
٢							

أسئلة :

١- هل يمكن رؤية الخلية البكتيرية دون صبغها ولماذا؟

٢- عرف الصبغة وأذكر أنواع الصبغات المستخدمة فى فحص البكتيريا .

٣- أذكر طرق الصبغ المختلفة

٤- أكمل الجمل الآتية :

أ- الصبغ .... وتستعمل فيه صبغة واحدة بينما الصبغ .... يستعمل فيه نوعين أو أكثر من الصبغات.

ب- ميكروب الـ*Bacillus subtilis* شكله .... ونظام التجمع السائد فيه هو .... بينما ميكروب .... شكله كروى ويتجمع فى .... أما ميكروب الـ*Saccharomyces* فشكله .... ولكن ميكروب .... شكله خيطى.

الدرس العملى الخامس عشر

الصبغ التفريقى

Diferentiation stainig

الصبغ التفريقى :

ويشتمل الصبغ المزدوج أو التفريقي على عدة طرق للصبغ مثل الصبغ بطريقة جرام وصبغ الجراثيم البكتيرية وصبغ البكتيريا الصامدة (المقاومة) للأحماض وكذلك صبغ الغلاف. وفى أى طريقة من هذه الطرق فإنه يستخدم نوعين أو أكثير من الصبغات وتسمى الصبغة الأولى بالصبغة الأساسية بينما تسمى الصبغة الثانية بالصبغة المضادة . وإذا أكتسب الميكروب لون الصبغة الأساسية فإنه يعتبر موجب لهذه الطريقة من الصبغ ، بينما إذا كان اللون النهائى له هو لون الصبغة المضادة فانه يعتبر سالبا لهذه الطريقة من الصبغ . وفيما يلى سوف نتناول كل طريقة من الطرق السابقة بشئ من التفصيل.

الصبغ بطرية جرام

Gram Staining

ويهدف هذا الدرس إلى تدريب الدارس على صبغ البكتيريا بطريقة جرام (Christian Gram 1884) وهى أهم طرق الصبغ المستخدمة فى تمييز الميكروبات والتفرقة بينها وذلك لإمكانية التعرف عليها . ويرجع أهمية الصبغ بطريقة جرام إلى أنها تعتبر من أهم الطرق المستعملة للتفرقة بين أجناس البكتيريا المختلفة إذ بواسطتها يمكن وضع البكتيريا فى مجموعة

البكتيريا الموجبة لصبغة جرام (G^+) Gram positive bacteria أو توضـــع في مجموعة البكتيريـــا الســـالبة لصـــبغة جــرام (G^-) Gram negative bacteria.

كذلك لها أهمية كبيرة للحكم على مدى نقاوة المزرعـــة البكتيريـــة . ولقد وجد أن هناك أنواع كثيرة من البكتيريا تظهر أحياناً موجبـــة وأحيانـــاً أخرى سالبة للصبغة ويطلق عليها البكتيريا المختلفة لصبغة جـــرام Gram variable bacteria وذلك بسبب صعوبة الطريقة فى عمليـــة إزالـــة اللـــون Decolorization حيث أن عدم الدقة فى إجراء عملية الصبغ لبعض أنـــواع البكتيريا يؤدى إلى نتائج خاطئة إذ تظهر بعض البكتيريا موجبة بتقصير مدة إزالة اللون وسالبة بإطالة هذه المدة. كذلك عدم الدقة فى تجهيـــز الغشـــاء البكتيرى حيث إنه إذا لم يكون الغشاء متجانس فإنه يستحيل الحصول علـــى نتائج صادقة لصعوبة ضبط عملية إزالة اللون بمذيبات الصبغ .

كذلك يمثل عمر المزرعة المستخدمة وعدم تناسب البيئة الغذائية لها عاملاً أساسياً حيث يجب أن تكون البكتيريا حديثة العمر مـــا بـــين ١٨-٢٤ سـعة نامية فى بيئة غذائية مناسبة . وإنخفاض درجة الـــpH والذى يضعف من قدرة البكتيريا على تقبل الصبغة ، هذا علاوة على معاملة الخلايا بإنزيم الريبونيوكليز Ribonuclase الذى يتسبب فى تكسير الجدار الخلوى المسئول عن الإيجابية والسلبية تجاه هذه الصبغة .

نظرية الصبغ بطريقة جرام : Theory of Gram stain

تتلخص نظرية هذه الطريقة فى أنه إذا صبغت البكتيريـــا بصـــبغة الجنسيان أو الكريستال البنفسجى ثم عوملت بمحلول اليـــود فـــإن بعضـــها يصعب إزلة الصبغة منها بالكحول أو الأسيتون وتظـــل خلاياهـــا محتفظـــة باللون البنفسجى ، ويطلق على مثل هذه البكتيريا موجبة لصبغة جرام بينمـــا

يوجد أجناس أخرى من البكتيريا إذا عوملت نفس المعاملة فإنه يمكن إزلة صبغة الجنسيان منه بسهولة بالمذيب المستخدم وبذلك يكتسب لون الصبغة المضادة وتسمى بالبكتيريا السالبة لجرام .

والسبب فى هذا الإختلاف هو أن الميكروبات الموجبة لجرام تحتوى على مركبات خاصة فى الغشاء السيتوبلازمى تتفاعل مع الجنسيان واليود مجتمعين مكونة مركباً معقداً يصعب على المذيب إزالته . والميكروبات السالبة لجرام لا يتكون فيها مثل هذا المركب المعقد وبالتالى يسهل على المذيب إزالة صبغة الجنسيان ، وعليه تصبغ هذه الميكروبات بالصبغة المضادة وهى الفوكسين أو السفرانين ويصبح لونها أحمر. ولقد أثبتت الأبحاث الحديثة أن المادة التى تتحد مع الجنسيان واليود لتكوين المركب المعقد هى ملح الماغنسيوم للحامض النووى RNA . ولقد أدخلت على هذه الطريقة من الصبغ بعض التعديلات من حيث زمن الصبغ وطريقة العمل ، ومن أهم هذه التعديلات تعديل هوكر والذي تستعمل فيه صبغة الجنسيان البنفسجى كصبغة أساسية وصبغة الفوكسين كصبغة مضادة .

تدريب رقم (٤٤) : صبغ البكتيريا بطريقة جرام تعديل هوكر

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزارع مائلة عمرها ٢٤ ساعة من كل من : *Bacillus subtilis* ، *Micrococcus luteus* ، *Streptomyces albus* *Pseudomonas fluorescens* – صبغة الجنسيان (كريستال بنفسجى) – محلول اليود – كحول إيثانول ٩٥% – فوكسين مخفف أو سفرانين مخفف – ورق نشاف – شرائح زجاجية نظيفة.

طريقة العمل :

١– حضر غشاء من المزرعة المراد فحصها وثبته كالمعتاد.

٢- أغمر الغشاء بصبغة الجنسيان البنفسجى لمدة دقيقة ثم أزل الصبغة من على الشريحة فى حوض الصبغ واغسل الغشاء بالماء.

٣- أغمر الغشاء بمحلول اليود لمدة دقيقة واحدة ثم إغسل بالماء وجفف بين ورقتى نشاف.

٤- ضع قليلاً من الكحول على الغشاء نقطة بنقطة مع إمالة الشريحة إلى الأمام وإلى الخلف وكرر هذه العملية حتى يصبح لون الكحول المزال رائقاً ثم إغسل بالماء.

٥- أغمر الغشاء بالفوكسن المخفف أو السفرانين المخفف لمدة نصف دقيقة ثم أزل الصبغة وإغسل بالماء.

٦- جفف الشريحة كالمعتاد بين ورقتى نشاف ثم على اللهب.

٧- إفحص بإستخدام العدسة الزيتية المنغمسة .

٨- صف وإرسم ما تشاهده ودون نتيجة الصبغ.

أسئلة :

١- أكمل ما يأتي:

عند صبغ ميكروب *Bacillus subtilis* بتكنيك جرام (تعديل هوكر) تستخدم صبغة .... كصبغة أساسية ولونها .... ومدة الصبغ بهـا .... ثم يستخدم محلول اليود بغرض .... وذلك بوضعه على الغشاء لمدة .... وبعد الغسيل بالكحول تستخدم صبغة .... ولونها .... ومدة الصبغ بها .... وتسمى بالصبغة .... وعند الفحص الميكروسكوبي بالزيتية المنغمسة وجد أن شكل الخلية لهذا الميكروب هو .... ونظام تجمعها السائد هو .... واللون النهائي لها .... وتسمى بكتيريا .... لجرام .

٢- علل لوجود البكتيريا المختلفة لصبغة جرام.

	الاسم العلمى للميكروب	نوع الصبغ	التكنيك المستخدم	الصبغة الأساسية	لون الصبغة الأساسية	الصبغة المضادة	لون الصبغة المضادة	اللون النهائى للميكروب	النتيجة	الرسم
١										
٢										
٣										
٤										

الدرس العملي السادس عشر

صبغ الجراثيم البكتيرية

Staining of Bacterial Spores

تكون بعض أنواع من البكتيريا أجساماً ذات جدر سميكة وتكون واحدة فقط في كل خلية وتسمى بالجرثومة Spore . ومن أهم الأجناس البكتيرية التي تكون جراثيم جنس *Bacillus* وجنس *Clostridium* وكلاهما يلعب دوراً خطيراً في فساد الأغذية المعلبة علاوة على دورهما في خصوبة التربة الزراعية . والجرثومة تكون أقل قابلية للصبغ عن الخلايا الخضرية بسبب جدارها السميك وتركيز البروتوبلازم نتيجة نقص الماء فيه . فإذا صبغت الخلايا البكتيرية المحتوية على الجراثيم بالصبغات العادية فإن الجرثومة لا تصبغ وتظهر كبقعة رائقة لامعة بينما تصبغ بقية الخلية بلون الصبغة المستعملة . وعند صبغ الجراثيم بطرق خاصة فإنها تحتفظ بالصبغة ويتعذر إزالتها ، أما الأجزاء الخضرية من الخلية فتزال منها الصبغة عند غسيلها بالماء فيسهل صبغها بعد ذلك بإحدى الصبغات المضادة البسيطة وهناك عدة طرق لصبغ الجراثيم من أهمها طريقة شيفروفلتون .

لذلك يهدف هذا الدرس إلى تدريب الدارس على إحدى طرق الصبغ الهامة المستخدمة في تمييز الميكروبات القادرة على تكوين الجراثيم والتفرقة بينها لسهولة التعرف عليها خاصة أنها تلعب الدور الأساسي في تلوث وفساد الأغذية المعلبة بجانب دورها البارز في خصوبة الأراضي الزراعية .

تدريب رقم (٤٥) : صبغ الجراثيم البكتيرية بطريقة شيفروفلتون

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزارع مائلة عمرها ٧٢ ساعة من كل من *Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, B. stearothermophilus, Pseudomonas fluorescens* – أخضر الملاكيت ٥٪ كصبغة أساسية – فوكسين مخفف أو محلول السفرانين ٠,٥٪ كصبغة مضادة – شرائح زجاجية نظيفة – ميكروسكوب ضوئي .

طريقة العمل:

١- حضر غشاء بكتيري لكل مزرعة من المزارع السابقة وثبته كالمعتاد.
٢- أغمر الغشاء بصبغة أخضر الملاكيت ثم سخن بإمرار اللهب تحت الشريحة إلى أن يبدأ البخار فى التصاعد فابعد اللهب ، وكرر ذلك لمدة ٥ دقائق مع مراعاة عدم جفاف الصبغة أو غليانها.
٣- تخلص من الصبغة المتبقية على الشريحة ثم إغسل الغشاء جيداً بالماء.
٤- أغمر الغشاء بالفوكسين المخفف لمدة نصف دقيقة ثم إغسل الغشاء جيداً بالماء.
٦- جفف الشريحة أعلى اللهب وإختبر الغشاء ميكروسكوبيا مستعملاً العدسة الزيتية المنغمسة .
٧- صف وإرسم ما تشاهده مع تدوين ملاحظاتك من حيث :

لون الجرثومة وموضعها فى الخلية – لون الجزء الخضرى من الخلية البكتيرية المتجرثمة (sporangium) – قطر الجرثومة بالنسبة لقطر الخلية ولاحظ ظهور الخلايا الخضرية باللون الأحمر وظهور الجراثيم باللون الأخضر.

	الإسم العلمى للميكروب	نوع الصبغ	التكنيك المستخدم	الصبغة الأساسية	لون الصبغة الأساسية	الصبغة المضادة	لون الصبغة المضادة	اللون النهائى للميكروب	النتيجة	الرسم
١										
٢										
٣										

أسئلة :

١- علل : مقاومة الجرثومة البكتيرية للصبغ بالطرق البسيطة

٢- أكمل ما يأتى:

أ- يستخدم تكنيك .... لصبغ الجراثيم البكتيرية والصبغة الأساسية فيه هى صبغة .... وتستعمل بتركيز .... ٪ مع .... والحذر من .... ولمدة .... وهى ذات لون .... أما الصبغة المضادة فهى صبغة .... ولونها .... وتستخدم لمدة .... بدون .... وتظهر الجرثومة باللون .... وهو لون الصبغة .... بينما يظهر الجزئ الخضرى بلون .... وعند صبغ ميكروب *Pseudomonas fluorescens* بهذه الطريقة كان اللون النهائى لخلاياه .... نظراً لعدم قدرة هذه الخلايا على تكوين ....

الدرس العملى السابع عشر

صبغ البكتيريا الصامدة للأحماض

Staining of Acid Fast Bacteria

توجد بعض أنواع من البكتيريا تكسو جدرها الخلوية طبقة دهنية أو شمعية لا تسمح للصبغة بتخللها عند الصبغ بالطرق البسيطة أو المعتادة ، ولهذا يستخدم لصبغها طرق خاصة يستعمل فيها محلول صبغة قوية يحتوى على مثبت للون Mordant of colour كالفينول ويترك عليها مدة طويلة أو يسخن قليلاً . ومتى صبغت هذه الأنواع من البكتيريا تثبت فيها الصبغة ويتعذر إزالتها منها حتى بإستعمال كحول مضاف إليه حامض acid alcohol ولهذه الخاصية أطلق عليها لفظ الصامدة أو المقاومة للأحماض . ولقد تتطورت عدة طرق لإختبار هذه الخاصية وهى كلها تعديلات للطريقة الأساسية التى تنحصر فى الصبغ بكربول الفوكسين كصبغة أساسية ثم إزالة اللون بالكحول ثم إضافة صبغة جديدة كصبغة مضادة .

لذلك يهدف هذا الدرس إلى تدريب الطالب على إحدى طرق الصبغ الهامة المستخدمة فى التفرقة بين الميكروبات وتشخيص بعض الأمراض الخطيرة والتى قد تسبب أيضاً تلوث وفساد بعض الأغذية . وترجع أهمية هذه الطريقة فى تشخيص مرض السل حيث أن ميكروب السل *M. tuberculosis* يتبع البكتيريا الصامدة للأحماض وهذا الميكروب هو الأساس فى بسترة اللبن .

تدريب رقم (٤٦) : صبغ البكتيريا الصامدة للأحماض بطريقة زيل نلسون

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزرعة مائلة لميكروب *Mycobacterium phlei* – ومزرعة مائلة لميكروب *Pseudomonas flourescens* – صبغة الكربول فوكسين المركز – كحول حامضى – صبغة أزرق الميثيلين – شرائح زجاجية نظيفة.

خطوات العمل:

١- حضر غشاء من البكتيريا المراد صبغها وثبته كالمعتاد.

٢- إغمر الغشاء بصبغة الكربول فوكسين ، ثم عرض الشريحة أعلى اللهب حتى تبدأ الصبغة فى التبخر .

٣- تكرر هذه العملية لمدة ٣-٥ دقائق مع مراعاة عدم جفاف الصبغة أو غليانها.

٤- أترك الغشاء يبرد فى الهواء ثم إغسله بالماء.

٥- إغمس الشريحة فى كأس به كحول حامضى لبضع ثوانى حتى يصبح لون الغشاء أحمر باهت Faint pink ثم إغسل جيداً بالماء لإزالة أثر الحامض المتبقى.

٦- إغمر الغشاء بصبغة إزرق الميثيلين لمدة ١-٢ دقيقة ثم إغسل بالماء وجفف أعلى اللهب كالمعتاد.

٧- إختبر الغشاء ميكروسكوبياً بإستعمال العدسة الزيتية .

٨- صف وإرسم ما تشاهده مع ملاحظ أن الميكروبات المقاومة للأحماض تظهر باللون الأحمر بينما الميكروبات غير المقاومة للأحماض تظهر باللون الأزرق.

	الإسم العلمى للميكروب	نوع الصبغ	التكنيك المستخدم	الصبغة الأساسية	لون الصبغة الأساسية	الصبغة المضادة	لون الصبغة المضادة	اللون النهائى للميكروب	النتيجة	الرسم
١										
٢										

أسئلة :

١- أذكر الأهمية الطبية لتكنيك الصبغ الصامد للأحماض .

٢- ما هو سبب مقاومة بعض أنواع البكتيريا للصبغ الصامد للأحماض.

٣- أكمل مايأتى :

عند صبغ ميكروب *Mycobacterium phlei* بتكنيك زيل نلسن تستخدم صبغة .... كصبغة أساسية ولونها .... ومدة التعرض لها .... مع مراعاة .... وبعد الغسيل بالكحول الحامضي تستخدم صبغة .... ولونها .... ومدة التعرض لها .... وعند الفحص الميكروسكوبي نلاحظ أن شكل هذا الميكروب .... ونظام تجمعه .... ولونه.......... لأنه ....

الدرس العملى الثامن عشر

الصبغ السالب

Negative Staining

يعتبر تكنيك الصبغ السالب للأغشية البكتيرية ذات أهمية كبرى فى فحص وتمييز البكتيريا . وتستخدم هذه الطريقة عند الرغبة في قياس حجم الخلية البكتيرية حيث تظهر الخلايا بحجمها الطبيعي لعدم إستخدام الحرارة مطلقاً أثناء إجراء خطوات الصبغ بهذه الطريقة . كما تستخدم هذه الطريقة لدراسة الشكل الظاهرى للبكتيريا وتسمى بالصبغة السالبة لأنه يتم صبغ الشريحة دون الخلايا البكتيرية ، فتظهر الخلايا شفافة غير مصبوغة ، بينما تظهر بقية الشريحة ملونة . ويرجع السبب فى عدم تخلل الصبغة جسم الخلية هو أن الصبغة المستخدمة تكون ذات جزيئات كبيرة لا تنفذ خلال الجدار الخلوى مثل الحبر الهندى Indian ink أو قد تكون صبغات حامضية عديمة أو قليلة التأثير على محتويات البروتوبلازم القاعدية مثل صبغة النيجروسين Nigrosin .

لذلك يهدف هذا الدرس إلى تنمية معرفة الدارس بإحدى الطرق المستخدمة في التعرف على شكل وحجم الخلية البكتيرية والتى تفيد فى تشخيص البكتيريا التى تلعب دوراً هاماً في حياتنا لوجودها في كل الأوساط المحيطة بالإنسان مثل دورها في خصوبة التربة الزراعية علاوة على أنها تسبب تلوث وفساد بعض الأغذية .

تدريب رقم (٤٧) : الصبغ السالب للبكتيريا

يجرى هذا التدريب بهدف تعريف الطالب بطريقة إجراء تكنيك الصبغ السالب والذى يفيد فى قياس حجم الخلية البكتيرية ودراسة نظام التجمع الخلوى .

الأدوات والمواد المطلوبة :

مزارع بكتيرية عمر ٢٤ ساعة لميكروب *Bacillus cereus* وميكروب *Saccharomyces cerevisiae*– حبر هندى أو نيجروسين – شرائح زجاجية نظيفة.

خطوات العمل:

١- ضع غمسة من المزرعة الموجودة أمامك على شريحة زجاجية نظيفة مع وضع نقطة من الحبر الهندى بدلاً من نقطة الماء .

٢- إنشر المخلوط على الشريحة جيداً .

٣- إترك الغشاء ليجف فى الهواء وإحذر من إستخدام الحرارة .

٤- إفحص بإستعمال العدسة الزيتية المنغمسة

٥- صف وإرسم ما تشاهده حيث يظهر الحقل الميكروسكوبي ملوناً بينما تظهر الخلايا شفافة.

أسئلة :

١- أذكر أهمية تكنيك الصبغ السالب – مع ذكر أسماء الصبغات المستخدمة في هذا التكنيك – وأهم ما يميز هذه الصبغات.

٢- يستخدم تكنيك الصبغ السالب بغرض .... و ....

٣- لماذا لا يستخدم اللهب فى تجفيف الشرائح عند إجراء هذا الصبغ .

٤- لماذا تظهر الخلايا البكتيرية شفافة عند فحصها بهذه الطريقة .

الدرس العملى التاسع عشر

قياس حجم الخلية البكتيرية

Measurement of Bacterial Cell Size

لطول وعرض الخلية البكتيرية العصوية أو قطر الخلايا البكتيرية الكروية أو خلية الخميرة أهمية فى تمييز أجناسها وأنواعها ، إذ تختلف أنواع البكتيريا فى طولها وعرضها وقطرها ، ولذا يعتبر قياس حجمها ضمن الطرق المورفولوجية للتعرف عليها . وتختبر البكتيريا المراد قياسها بإستخدام الأغشية المصبوغة ، ولو أن تجفيف الغشاء وتثبيته يسببان إنكماشها ، لذلك كان من الأفضل إستخدام تكنيك الصبغ السالب عند الرغبة فى الحصول على الحجم الحقيقي للبكتيريا . ووحدة القياس المستعملة لقياس حجم الخلايا هى الميكرون (١/١٠٠٠ من الميليميتر) . ولقياس حجم البكتيريا تستعمل عدسة عينية خاصة مجهزة بميكروميتر Micrometer أى مقياس مدرج لكنه مجهول وتسمى العينية الميكرومترية . ولمعرفة ما يساويه كل قسم من أقسام ميكروميتر العدسة العينية بالميكرونات تستخدم شريحة ميكرومترية خاصة بها مقياس طوله ٢ مم ومقسم إلى ٢٠٠ قسم من الأقسام المتساوية ، أى أن كل قسم منها يساوى ١/١٠٠ مم أى ١٠ ميكرون.

لذلك يهدف هذا الدرس إلى إكساب الدارس مهارة قياس أحجام الخلايا البكتيرية كإحدى الوسائل الهامة فى التفرقة بينها وسهولة التعرف عليها وذلك في مجالات الميكروبيولوجيا المختلفة مثل ميكروبيولوجيا الأراضى والمياه والأغذية والألبان .

تدريب رقم (٤٨) : معايرة العدسة العينية الميكرومترية

يجرى هذا التدريب بغرض تقدير ما يساويه كل قسم من أقسام العدسة العينية الميكرومترية المجهولة باستعمال العدسة الشيئية الكبرى أو الزيتية وبالإستعانة بالشريحة الميكرومترية تمهيداً لإستخدامها فى قياس حجم الخلية البكتيرية أو قياس حجم خلية الخميرة أو جراثيم الفطر .

الأدوات والمواد المطلوبة:

مقياس العينية Ocular micrometer – الشريحة الميكرومترية Stage micrometer – تحضير لأغشية بكتيرية مصبوغة بطريقة الصبغ السالب – مزرعة مائلة لميكروب *Bacillus* sp. – مزرعة مائلة لميكروب *Saccharomyces cerevisiae* – مزرعة مائلة لميكروب *Pseudomonas putida*

خطوات العمل :

١- ضع الشريحة الميكرومترية على مسرح الميكروسكوب وثبتها بالمقابض ثم إفحص بالعدسة الشيئية الصغري حتى ترى المقياس فى وسط مجال النظر ويمكن رؤيته بوضوح إذا حُجب الضوء جزئياً بواسطة الحجاب.

٢- إستبدل الشيئية الصغرى بالكبرى أو بالعدسة الزيتية المنغمسة مع وضع نقطة من زيت السيدر على الشريحة ، واضبط بواسطة المعدل الدقيق حتى ترى المقياس المدرج.

٣- إرفع عينية الميكروسكوب العادية وإستبدلها بالعينية الميكرومترية واضبط بالمعدل الدقيق حتى ترى مقياس العينية ومقياس الشريحة متوازيان ومنطبقان.

٤- حدد خط من العينية منطبق على خط من خطوط مقياس الشريحة ، ثم حدد خطين تاليين منطبقين ثم عد الأقسام المحصورة بين خطى العينية وعدد الأقسام المحصورة بين خطى الشريحة الميكرومترية .

٥- إحسب طول كل قسم من أقسام العينية الميكرومترية.

وهو يساوى عدد أقسام الشريحة × ١٠ مقسوماً على عدد أقسام العينية.

٦- إستبدل الشريحة الميكرومترية بالتحضير المراد قياس حجم خلاياه وإستخدم الميكروميتر العينى بعد معايرته فى قياس حجم الخلية وذلك بتحريك التحضير إلى أن يقع أحد طرفى الخلية على أحد أقسام العدسة ثم حدّد بالنظر عدد الأقسام المحصورة بين طرفى الخلية.

٧- يقاس الطول والعرض للخلية البكتيرية العصوية *Bacillus* sp. أو طول وعرض الخلية البكتيرية العصوية القصيرة ويقاس القطر بالنسبة للخلية البكتيرية الكروية أو خلية الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* .

تدريب رقم (٤٩) : تقدير المعامل الميكروسكوبى

يعرف المعامل الميكروسكوبى على أنه عبارة عن عدد الحقول الميكروسكوبية الموجودة فى مساحة مقدارها ١سم^{٢} ولتقديره لابد أولاً من تقدير قطر المجال الميكروسكوبى والذي منه يمكن حساب مساحته .

لذلك يكون الغرض من التدريب هو أكساب الدارس مهارة تقدير أعداد الميكروبات فى أوساطها الطبيعية المختلفة مثل الماء أو أى مادة غذائية أو اللبن. كذلك يجب أن يعرف كيفية تقدير المعامل الميكروسكوبى لاستخدامه فى المعادلات الحسابية الخاصة بتقدير أعداد البكتيريا فى العينات تحت الدراسة .

الأدوات والمواد المطلوبة:

الشريحة الميكرومترية Stage micrometer – ميكروسكوب ضوئي

خطوات العمل :

١- ضع الشريحة الميكرومترية على مسرح الميكروسكوب وحركها إلى أن تقع بداية التدريج على محيط الحقل الميكروسكوبي .

٢- قدر عدد الأقسام من الشريحة الميكرومتيرية المحصورة بين المحيطين داخل الدائرة ولتكن ٤ أقسام وبذلك يكون قطر المجال الميكروسكوبي = ٤ × ١٠ = ٤٠ ميكرون.

٣- عين مساحة المجال الميكروسكوبي كالآتي : مساحة الدائرة = ط نق٢

مساحة المجال الميكروسكوبي = ٣,١٤ × ٢٠٢

= ٣,١٤ × ٤٠٠

= ١٢٥٦ ميكرون مربع

مساحة اسم٢ بالميكرونات المربعة = (١٠ × ١٠٠٠)٢

= ١٠^٨ ميكرون مربع

إذن المعامل الميكروسكوبي = ١٠^٨ ÷ ١٢٥٦ = ٤٩٧٦

= ٥٠٠٠ حقل ميكروسكوبي تقريباً

أسئلة :

١- عرف المعامل الميكروسكوبي وأهميته .

٢- أذكر وظيفة كل من :

الشريحة الميكرومترية – العدسة الميكرومترية

الدرس العملى العشرين

إختبار الحركة فى البكتيريا

Examination of Bacterial Motility

الغرض من الدرس هو تنمية مهارة الدارس فى التعرف على البكتيريا من خلال إكسابه القدرة على إجراء إختبار حركة البكتيريا كأحد الفروق التمييزية الهامة بين الميكروبات . حيث تنقسم البكتيريا من حيث قدرتها على الحركة إلى مجموعتين هما البكتيريا المتحركة حركة حقيقية والبكتيريا غير المتحركة . وحركة البكتيريا تلاحظ بدقة فى المزارع السائلة. وتنشأ الحركة فى أغلب أنواع البكتيريا نتيجة وجود زوائد تمتد من الخلية البكتيرية تعرف بالفلاجلات Flagella . وهذه الفلاجلات لا ترى فى التحضيرات غير المصبوغة ، ولكن يمكن مشاهدتها بصبغ البكتيريا بطرق خاصة . وتعرف الحركة فى البكتيريا بالحركة الذاتية أو الحقيقية حيث تنتقل فيها البكتيريا من مكانها إلى مكان آخر ، وهذه الحركة الذاتية أو الحقيقية إما أن تكون سريعة أو بطيئة نسبياً . والبكتيريا الحلزونية وكثير من البكتيريا العصوية من المجموعة المتحركة ذاتياً ، بينما يندر وجود هذه الحركة فى الأنواع الكروية . وفى حالة البكتيريا غير المتحركة تظهر مهتزة دون أن تنتقل من مكانها وذلك نتيجة تلاطم جزيئات السائل الموجودة فيه ، وتسمى هذه الحركة بالحركة البراونية Brownian movement أو الحركة الكاذبة . ويستعمل فى إختبار حركة البكتيريا إحدى طريقتين هما طريقة النقطة المعلقة وطريقة تلقيح أنابيب الأجار العميق بالوخز .

تدريب رقم (٥٠): تحضير النقطة المعلقة Hanging drop preparation

فى هذا التحضير تختبر البكتيريا حية غير مصبوغة ، وينبغى ألا يزيد عمر المزرعة المختبرة على ١٨- ٢٤ ساعة خاصة فى البكتيريا المتجرثمة حتى لا تتحول الخلايا إلى جراثيم وتفقد قدرتها على الحركة نتيجة عدم وجود الفلاجلات.

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزارع بويون مغذى عمرها ٢٠ ساعة لكل من *Bacillus subtilis* و *Micrococcus* sp. و *Saccharomyces cerevisiae* – شرائح ذات فجوة أو شرائح عادية – أغطية شرائح – فازلين – جوان جلد صغير .

خطوات العمل :

١- ضع غطاء شريحة زجاجية نظيفة على المنضدة ثم رج مزرعة البويون المراد إختبارها وخذ نقطة بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة المعقمة وضعها فى وسط الغطاء .

٢- ضع الشريحة ذات الفجوة أمامك على المنضدة ، وبواسطة قضيب زجاجى ضع أربعة نقط صغيرة من الفازلين حول تجويف الشريحة ، وفى حالة عدم وجود الشريحة ذات الفجوة يستعاض عنها بشريحة عادية مع وضع الجوان الجلد بوسط الشريحة وتثبيته بحيث تكون النقطة فى وسط الجوان الجلد .

٣- إرفع الشريحة وإقلبها وضعها على غطاء الشريحة الزجاجية بإحتراس بحيث تكون نقطة البويون فى منتصف التجويف دون أن تلمس الشريحة فيلتصق الغطاء بالشريحة.

٤- إقلب الشريحة ثانية ولاحظ أن النقطة معلقة ولا تلمس قاع الفجوة ، ثم ثبتها على مسرح الميكروسكوب بواسطة المقابض ، وإفحص بالعدسة الشيئية الصغرى مع تقليل الضوء الداخل إلى الميكروسكوب بقفل الحجاب جزئياً ، ثم إبحث عن حافة النقطة واضبط حتى تراها واضحة .

٥- عدل موضع الشريحة حتى ترى حافة النقطة فى وسط مجال الفحص .

٦- إفحص بواسطة العدسة الشيئية الكبرى مع إستعمال المعدل الدقيق بإحتراس شديد ، وعدل كذلك قوة الإضاءة حتى ترى حافة النقطة ، وعند ذلك تشاهد البكتيريا بكثرة بجوار الحافة ويمكنك تميز حركتها بوضوح .

٧- دون نتيجة الحركة لكل ميكروب تحت الدراسة .

تدريب رقم (٥١) : تلقيح بيئة الأجار المغذى بالوخز

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزارع بويون مغذى عمرها ٢٤ ساعة لكل من *Bacillus subtilis* ، *Micrococcus* sp. – أنابيب تحتوى على بيئة أجار مغذي عميق .

خطوات العمل :

١- لقح بالإبرة المستقيمة عدة أنابيب من الأجار المغذي العميق مستعملاً طريقة الوخز من كل من مزرعتى .*Micrococcus* sp و *Bacilus subtilis* . وذلك بوخز جزء من النمو البكتيرى بواسطة الإبرة المستقيمة بعد تعقيمها وذلك فى منتصف بيئة الأجار المغذى العميق بحيث تكون الإبرة فى خط مستقيم وموازية لجدار الإنبوبة بقد الإمكان ويمكن إجراء ذلك بتمكن بوضع الإنبوبة والإبرة فى مستوى رأسي على أن تكون الأنبوبة مقلوبة وبذلك يمكنك تجنب التلوث بميكروبات الهواء .

٢- ضع الأنابيب فى الحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٣ أيام ثم إختبر الأنابيب أثنائها لتحديد مكان نمو البكتيريا حيث أنه فى حالة البكتيريا المتحركة تلاحظ نمو متفرع خارج من خط الوخز بينما لا يشاهد ذلك فى البكتيريا غير المتحركة .

أسئلة :

أكمل :

من أمثلة البكتيريا المتحركة ميكروب .... و .... وتتم فيه الحركة بواسطة .... ويسمى هذا النوع من الحركة بالحركة .... بينما يعتبر ميكروب .... من الميكروبات غير المتحركة والتى عند إختبار مقدرتها على الحركة نجد أنها .... أو قد تظهر .... دون أن تنتقل من مكانها وذلك نتيجة .... ويسمى هذا النوع من الحركة بالحركة .... وعموماً يمكن دراسة الحركة فى البكتيريا بإختبارين هما إختبار .... وإختبار...............

الدرس العملي الحادي والعشرون

ميكروبيولوجيا التربة الزراعية

Soil Microbiology

تعتبر التربة الزراعية وسطاً مناسباً لنمو الكثير من أنواع الكائنات الحية الدقيقة من بكتيريا وفطريات وطحالب وفيروسات وبروتوزوا . والكثير من هذه الكائنات الحية لها دور حيوي وهام فى خصوبة التربة الزراعية نظراً لما تقوم به من تحولات بيولوجية فى دورات العناصر المختلفة . ولهذا يستهدف هذا الدرس إكساب الدارس مهارة التعرف على أشكال الميكروبات التى تسكن التربة الزراعية وتنمية مهارته فى إستخدام بعض الطرق المستعملة فى عد ميكروبات الأراضي وكيفية عزل بعض أنواع البكتيريا ذات الصلة بخصوبة التربة الزراعية . ويتم دراسة ميكروبات التربة الزراعية وصفياً بطريقة الشريحة المطمورة أو المغمورة والتى تسمى طريقة روسى وكلودنى .

تدريب رقم (٥٢) : تكنيك الشريحة المطمورة بطريقة روسى وكلودنى Rossi and Cholodny`s Burried Slide Technique

الأدوات والمواد المطلوبة :

تربة زراعية خصبة منخولة جيداً – نشا – ردة – ببتون – مسحوق نبات جاف – أربع أوعية زجاجية نظيفة – صبغة كربول إيرثروسين Carbol erythrosine

خطوات العمل:

١- ضع حوالى ١٠٠ جرام من التربة الزراعية الخصبة فى كل وعاء من الأوعية الزجاجية الأربعة سابقة التحضير .

٢- إخلط التربة الزراعية جيدا فى الوعاء الأول مع نصف جرام نشا وفى الوعاء الثانى مع نصف جرام ردة وفى الوعاء الثالث مع نصف جرام ببتون وفى الوعاء الرابع مع نصف جرام مسحوق نباتى جاف ثم عدل الرطوبة فى كل وعاء إلى ٤٠-٥٠٪.

٣- إغمر فى كل وعاء شرائح زجاجية نظيفة واضغط التربة حولها ثم غطى الأوعية بغطاء لتقيل البخر . ضع الأوعية فى الحضان على درجة حرارة ٢٢-٢٥°م أو على درجة حرارة المعمل لمدة إسبوع.

٤- بعد فترة التحضين أخرج الشرائح بملقط ثم نظفها مما يكون قد علق بها من التربة الزراعية . وذلك بإمرار تيار خفيف من الماء على أحد سطحيها ثم جفف الشرائح هوائياً ثم ثبت الغشاء المتكون نتيجة إلتصاق التربة الزراعية بالشريحة بإمرارد أعلى لهب ضعيف.

٥- إصبغ الغشاء بصبغة كربول الإيرثروسين وذلك بوضع الصبغة على الشريحة لمدة ٥ دقائق مع وضع الشريحة على كأس به ماء يغلى أو بإستخدام حمام مائى ولا تجعل الصبغة تجف خلال هذه المدة.

٦- إغسل الشريحة جيداً بعد ذلك ثم جففها وإفحص الغشاء ميكروسكوبياً باستخدام العدسة الزيتية المنغمسة.

٧- صف الميكروبات التى تراها وإرسمها وقارن بين أشكالها ونظام تجمع كل منها ومدى سيادة أى منها فى الأوعية الأربعة.

٨- علل النتائج التى حصلت عليها مستعيناً بالمادة المضافة لكل وعاء تحت الدراسة .

تدريب رقم (٥٣) : عد ميكروبات التربة الزراعية بطريقة الأطباق

نظراً لأن طريقة العد بالأطباق من الطرق المعملية الهامة المستخدمة فى تقدير أعداد الميكروبات بالتربة الزراعية . ورغم ما تتميز به هذه الطريقة فى كونها تعد الخلايا الحية فقط دون الميتة ، إلا أن لها الكثير من العيوب والتى من أهمها أن البيئة المستعملة فى العد وكذلك درجة حرارة التحضين قد لا تكون مناسبة لجميع أنواع الميكروبات الموجودة فى عينة التربة الزراعية تحت الدراسة . كما أن هذ الطريقة تعتبر أن كل مستعمرة ميكروبية نامية على أطباق العد كأنها ناتجة عن نمو خلية واحدة ولكن الواقع أنه قد تنمو المستعمرة من خلية واحدة فعلاً أو سلسلة أو كتلة من الخلايا حسب وجود البكتريا فى معلق التربة الزراعية . هذا بالإضافة إلى عدم توفر الإحتياجات الهوائية المناسبة لكل الميكروبات مما يؤدى إلى الحصول على أعداد أقل بكثير من الواقع. ورغم ذلك تعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرق إستعمالاً لعد ميكروبات التربة الزراعية . لذلك يجرى هذا التدريب بغرض إكساب الدارس القدرة على تقدير أعداد الميكروبات فى عينات التربة الزراعية .

الأدوات والمواد المطلوبة :

أطباق بترى معقمة – ماصات معقمة سعة ١٠ سم^{٣} ، ١ سم^{٣}– زجاجات عينات نظيفة تحتوى كل منها على ٩٠ سم^{٣} ماء حنفية معقم أو محلول فسيولوجى معقم – أنابيب تحتوى على بيئة أجار مستخلص التربة معقمة – عينة التربة الخصبة المراد دراستها – ترمومتر – حمام مائي.

طريقة العمل :

١- قدر الرطوبة فى عينة التربة الزراعية موضع الدراسة حتى يتسنى حساب النتائج التى سوف تحصل عليها على أساس الوزن الجاف.

٢- زن ١٠ جرام من العينة وضعها فى إحدى زجاجات العينا ت المحتوية على ٩٠ سم^{3} ماء معقم أو محلول فسيولوجي معقم ثم رجها جيداً لمدة ١٠ دقائق وذلك للحصول على التخفيف الأول (١٠$^{-1}$).

٣- بواسطة ماصة معقمة خذ ١٠ سم^{3} من زجاجة التخفيف ١٠$^{-1}$ وإنقلها إلى زجاجة تخفيف أخرى بها ٩٠ سم^{3} من الماء أوالمحلول الفسيولوجي المعقم ورج لتحصل على تخفيف ١٠$^{-2}$. كرر هذه العملية حتى تخفيف واحد على مليون (١٠$^{-6}$) أو واحد على عشرة ملايين (١٠$^{-7}$).

٤- إستخدم آخر ثلاث تخفيفات لتلقيح أطباق بترى المعقمة وذلك بنقل ١ سم^{3} لكل طبق بإستخدام ماصة معقمة وأكتب على كل طبق التخفيف المستخدم مع مراعاة إستخدام ٣ أطباق على الأقل لكل تخيف (٣ مكررات) وذلك لإمكانية تحليل النتائج إحصائياً لتجنب الأخطاء التجريبية .

٥- سيح البيئة الغذائية على حمام مائي وبرد إلى ٥٠°م ثم صب الأطباق الملقحة بالكميات المناسبة . حرك الأطباق حركة رحوية حتى تمتزج البيئة مع معلق التربة الزراعية مزجا متجانساً . أترك الأطباق حتى تتجمد البيئة الغذائية ثم ضع الأطباق فى الحضان على درجة حرارة مناسبة (٢٥ -٢٨°م) لمدة أسبوع.

٦- بعد فترة التحضين عد المستعمرات النامية فى الأطباق مع إستبعاد الأطباق التى تحتوى على أقل من ٣٠ أو أكثر من ٣٠٠ مستعمرة أو تلك التى تحتوى على مستعمرات منتشرة أو المستعمرات المتداخلة .

٧- إحسب متوسط عدد المستعمرات الناتجة لكل تخفيف ثم إضربه فى مقلوب هذا التخفيف المستخدم فينتج عدد الميكروبات فى الجرام الواحد من التربة الزراعة الرطبة . عدل النتائج المتحصل عليها على أساس الوزن الجاف .

تدريب رقم (٤د) : عد وعزل فطريات التربة الزراعية بطريقة الأطباق

الأدوات والمواد المطلوبة :

أطباق بترى معقمة – ماصات معقمة – شرائح زجاجية وأغطية شرائح – زجاجات تخفيفات تحتوى كلاً منها على ٩٠ سم³ ماء حنفية معقم – محلول من المضاد البكتيرى سلفات ستربتوميسين والذي يضاف بمعدل ٠,٠٣ جرام / لتر – محلول اللاكتوفينول – عينة التربة الزراعية – بيئة مارتن.

طريقة العمل

١- قدر الرطوبة فى عينة التربة الزراعية تحت الدراسة حتى يتسنى حساب النتائج التى سوف تحصل عليها على أساس الوزن الجاف

٢- إعمل تخفيفات التربة الزراعية كما تعلمت في التدريب السابق .

٣- إستخدم آخر ثلاث تخفيفات ولقح ٣ أطباق بترى من كل تخفيف وذلك بمعدل ١ سم³ لكل طبق.

٤- سيح بيئة مارتن على حمام مائى ثم برد إلى ٥٠°م وأضف إليها سلفات الأستربتوميسين (٠,٠٣ جم / لتر) ، ثم صبها فى الأطباق الملقحة بمعدل ١٥ سم^3 لكل طبق مع تحريك الأطباق حركة رحوية لمزج البيئة الغذائية مع معلق التربة الزراعية . أترك الأطباق لفترة مناسبة حتى تتجمد البيئة الغذائية .

٥- حضن الأطباق مقلوبة على درجة الحرارة ٢٥°م لمدة ٧ أيام ، وبعد التحضين قدر عدد المستعمرات النامية على الأطباق ومنها قدر العدد الكلى للفطريات لكل جرام تربة محسوبة على أساس الوزن الجاف.

٦- حاول عزل بعض هذه المستعمرات وفحصها ميكروسكوبياً بإستعمال محلول اللاكتوفينول ووضع غطاء الشريحة عليها ويتم الفحص بإستعمال العدسة الصغرى ثم الكبرى .

٧- إرسم أشكال الفطريات المختلفة التى حصلت عليها مبيناً نظام التفرع الميسليومى وأشكال الحوافظ الجرثومية لكل منها .

٨- إقترح الإسم العلمى لجنس الفطر من خلال شكل الجرثومة بالإستعانة بمدرس الحصة .

تدريب رقم (٥٥) : طريقة العد التقريبية Most Propable Number Method

تستخدم طريقة العد التقريبية فى عد بعض المجاميع الميكروبية المتخصصة وذلك بسبب عدم وجود بيئة خاصة تسمح بنمو تلك المجاميع عليها دون غيرها من الميكروبات الموجودة بالتربة الزراعية ، وكذلك لعدم انتظام ظهور تلك المستعمرات البكتيرية على الأطباق .

الأدوات والمواد المطلوبة :

عينة التربة الخصبة المراد دراستها – ماصات معقمة سعة ١٠ سم^3 ، ١سم^3. زجاجات التخفيفات تحتوى كل منها على ٩٠ سم^3 ماء حنفية معقم . عدد ٢٥ أنبوبة تحتوى كل منها على ٥–٧ سم^3 من البيئة السائلة المعقمة المطلوبة للدراسة .

طريقة العمل

١– إعمل التخفيفات كما سبق توضيحه فى طريقة العد بالأطباق.

٢– إستخدم آخر ٥ تخفيفات ومن كل تخفيف لقح ٥ أنابيب وذلك بمقدار ١سم^3 لكل أنبوبة ثم رقم الأنابيب.

٣– حضن الأنابيب الملقحة فى الحضان على درجة الحرارة المناسبة والمدة المناسبة وذلك وفقاً للميكروبات المراد عدها .

٤– بعد فترة التحضين دون النتائج من خلال الأنابيب التى أعطت نتيجة موجبة أمام كل تخفيف ثم إستخرج الأعداد المحتملة للمجموعة الميكروبية موضع الدراسة فى الجرام الرطب من التربة الزراعية وذلك من جداول العد التقريبية الموضوعة لذلك الغرض . عدل النتائج المتحصل عليها على أساس الوزن الجاف (أنظر جداول العد التقريبية).

تدريب رقم (٥٦) : عد وعزل بكتيريا *Clostridium* المثبتة لأزوت الهواء الجوى

الأدوات والمواد المطلوبة:

عينة تربة زراعية – زجاجات التخفيفات بكل منها ٩٠ سم^3 ماء حنفية – ماصات معقمة – بيئة السكروز ومستخلص الخميرة السائلة (بيئة وينوجرادسكى المعدلة) .

خطوات العمل :

١- جهز سلسلة التخفيفات العشرية بالطريقة المعتادة إستخدم آخـــر خمســـة تخفيفات .

٢- بستر هذه التخفيفات وذلك بوضعها فى حمام مائي على درجـــة ٨٠ °م لمدة ١٥ دقيقة.

٣- توزع البيئة فى أنابيب بعد وضع مسمار حديد لامع فى كل إنبوبـــة ثـــم تعقم الأنابيب.

٤- لقح خمس أنابيب من كل تخفيف ثم إحجز وسط البيئـــة عـــن الهـــواء الخارجي وذلك بتغطية سطحها بطبقة من الفاسبار السائل والمبـــرد إلـــى ٥٠ °م وبعد ذلك سد الأنابيب بالسدادات القطنية وذلك تحت شروط التعقيم.

٥- حضن الأنابيب على درجة الحرارة المناسبة (٢٥-٢٨°م) لمدة أسبوعين.

٦- سجل الأنابيب الموجبة والتى يستدل عليها بتكوين غـــاز يـــدفع طبقـــة الفاسبار إلى أعلى كما يتم التأكـــد بـــالفحص الميكروســـكوبي لمشـــاهدة البكتيريا المتجرثمة.

٧- إحسب النتائج بإستخدام جداول العد التقريبية ثم عدلها على أساس الوزن الجاف للتربة الزراعية قيد الدراسة .

٨- يمكن عزل الميكروب بحالة نقية بواســـطة العـــزل بطريقـــة الأطبـــاق المخطوطة مع تنميته تحـــت الظـــروف اللاهوائيـــة وذلـــك باســـتخدام Anaerobic Jar (Anaero Jar, AG 25, Oxoid)

تدريب رقم (٥٧) : عد وعزل الميكروبات الهوائية المحللة للسليلوز

الأدوات والمواد المطلوبة:

عينة تربة زراعية – ماصات معقمة – زجاجات التخفيفات التى تحتوى كل منها على ٩٠ سم^{٣} ماء حنفية معقم – بيئة دوبس Dubos medium .

طريقة العمل :

١- إعمل سلسلة التخفيفات بالطريقة المعتادة إستخدم آخر ٥ تخفيفات.

٢- وزع بيئة دوبس فى الأنابيب بمعدل ٥ سم^{٣} لكل إنبوبة مع وضع شريط من ورق الترشيح كمصدر للسليلوز فى كل إنبوبة بحيث يكون جـــزء منهـــ مغمور فى البيئة وجزء فوق سطحها ثم عقم الأنابيب.

٣- من كل تخفيف لقح ٥ أنابيب بإضافة ١سم^{٣} لكل أنبوبة ثم رقم الأنابيب.

٤- حضن الأنابيب على درجة حرارة ٢٨-٣٠°م لمدة ٢-٣ أسابيع.

٥- بعد فترة التحصين سجل الأنابيب التى تعطى نتيجة موجبة والتى يستدل عليها بظهور بقع صفراء أو بنية أو مسودة خاصة فى موضع ملامســـتها لسطح البيئة مع ظهورتآكل فى ورق ترشيح وتفتتها عند رج الأنبوبة رجاً خفيفاً.

٦- إحسب النتائج بإستخدام جداول العد التقريبية ثم عدل النتائج على أساس الوزن الجاف مستعيناً بنسبة الرطوبة بعينة التربة الزراعية المســـتخدمة والتى سبق لك حسابها .

٧- من الأنابيب التى أعطت نتيجة موجبة إنزع جزء من ورقة الترشيح التى عليها البقع وفتتها فى قليل من الماء المعقم فى طبق بترى.

٨- خذ جزء من الملعق وإعمل منه غشاء وإصبغه بصبغة الفوكسين للتعرف على شكل الميكروبات والتي يمكن عزلها فى صورة مزارع نقيــة مــن المحلول بطريقة التخطيط.

تدريب رقم (٥٨) : عزل بكتيريا العقد الجذرية *Rhizobium* spp.

الأدوات والمواد المطلوبة:

جذر نبات بقولى عليه عقد جذرية صادقة – ملقط – مشرط – ساق زجاجية معقمة – إبرة تلقيح ذات عقدة – عدد ٤ أطباق بترى أحدها يحتــوى علــى محلول سليماني ١ جرام/لتر والآخر يحتوى علــى كحــول ٩٥٪ والثالــث يحتوى على ١٥ سم٣ ماء معقم والرابع يحتوى على ١سـم٣ مــاء معقــم – أطباق بترى فارغة معقمة – أنابيب إختبار تحتوى على بيئة أجار المانيتول ومستخلص الخميرة.

خطوات العمل :

١- إغسل جذر النبات البقولي تحت الدراسة بالماء العادى ثم بالماء المعقــم وذلك بعد التخلص من بقايا التربة الزراعية .

٢- إفصل عقدة كبيرة الحجم بواسطة مشرط معقم واقطعها مع جزء صغير من الجذر ثم إغسلها جيداً بالماء المعقم لإزالة ما بقى من حبيبات التربــة الزراعية.

٣- ضع العقدة فى محلول السليمانى لمدة ٦ دقائق مع التحريك ثــم انقلهــا بواسطة ملقط معقم إلى الكحول ٩٥٪ لمدة ٥ دقائق ثم إنقلها إلى الطبــق المحتوى على ١٥ سم٣ من الماء المعقم مع تقليبها لــتخلص مــن بقايــا السليمانى والكحول.

٤- إنقل العقدة بعد ذلك إلى الطبق المحتوى على ١سم٣ ماء معقم ثم إهرسها جيداً وفتتها فى الماء لتكون معلق بكتيري وذلك بالإستعانة بالملقط المعقم أو بطرف الساق الزجاجية المعقمة.

٥- سيح أنابيب أجار المانيتول ومستخلص الخميرة ثم إتركها لتبرد عند ٤٥°م ثم صبها فى الأطباق المعقمة تحت شروط التعقيم واترك البيئة حتى تتصلب فى الأطباق.

٦- خذ جزء من المعلق البكتيري الناتج من تفتيت العقدة على طرف إبرة التلقيح المعقمة وخطط بها على سطح بيئة أجار المانيتول ومستخلص التربة المتجمدة وبنفس الإبرة وبدون غمسها لقح الطبق الثانى ثم الثالث وهكذا. يمكن إستخدام طريقة الأطباق المصبوبة فى عزل الميكروب بدلاً من طريقة الأطباق المخطوطة .

٧- ضع الأطباق الملقحة مقلوبة فى الحضان على درجة ٢٦-٢٨°م لمدة أسبوع ثم إفحص المستعمرات الناتجة بعد التحضين وتعرف على خصائصها المزرعية . إعزلها بحالة نقية على البيئة المائلة بعد عمن غشاء منها وصبغه بطريقة جرام ثم فحصه ميكروسكوبيا للتعرف على خصائص الميكروب المورفولوجية ونظام تجمع خلاياه. يمكن أخذ جزء من المعلق البكتيرى وتجهيز غشاء منه وصبغه وفحصه ميكروسكوبياً للتعرف على أشكال البكتيرويدات Bacteroid shaped cells وهى أشكال الخلايا المسئولة عن عملية تثبيت النيتروجين داخل العقدة البكتيرية.

تدريب رقم (٥٩) : عزل بكتيريا الأزوتوباكتر *Azotobacter* المثبتة للأزوت الجوى

الأدوات والمواد المطلوبة:

عينة تربة زراعية خصبة – ماصات معقمة – أطباق بترى معقمة – زجاجات العينات التى تحتوى كل منها على ٩٠ سم^3 ماء حنفية – دوارق تحتوى على بيئة المانيتول والسكروز السائلة المعقمة والخالية من النيتروجين وذلك بمعدل ٢٥ سم^3 لكل دورق – أنابيب تحتوى على بيئة أجار المانيتول والسكروز المعقمة .

خطوات العمل :

١- إعمل سلسة التخفيفات العشرية كما سبق فى طريقة العد بالأطباق.

٢- لقح كل دورق من الدوارق المحتوية على البيئة السائلة بمعدل ١سم^3 لكل دورق.

٣- حضن الدوارق على درجة ٢٥-٢٨°م لمدة أسبوعين ثم إفحص لمعرفة وجود خلايا الأزوتوباكتر بكل دورق وذلك بظهور الغشاء المميز . وكذلك بالفحص الميكروسكوبي بعد عمل غشاء وصبغه بطريقة جرام وذلك للتأكد من وجود خلايا الأزوتوباكتر البيضاوية المفردة أو المتجمعة فى أزواج والسالبة لجرام والتى يحاط كل زوج منها بطبقة لزجة يطلق عليها الكبسول.

٤- يمكنك عزل الأزوتوباكتر بطريقة الأطباق المخطوطة أو المصبوبة على البيئة الصلبة.

٥- حضن الأطباق على درجة ٢٥-٢٨°م حتى ظهور المستعمرات ثم إفحص هذه المستعمرات ميكروسكوبياً بإستمرار والتى تتميز بقوامها المخاطى. وإذا شوهدت إحدى المستعمرات نقية ينقل جزء منها إلى أنابيب البيئة الصلبة المائلة وتحضن على نفس الدرجة مع التأكد من نقاوتها بعد ذلك بالفحص الميكروسكوبي.

أسئلة :

١- أذكر بعض العوامل التى تؤثر على نتائج العد الميكروبى بطريقة الأطباق.

٢- لماذا تعطى طريقة العد الميكروبى بالأطباق أعداداً أقل من الواقع .

٣- عند عد المستعمرات البكتيرية فى ثلاث أطباق ملقحة من التخفيف الرابع (١٠^-٤^) من معلق تربة خصبة وجد أنها ١٧٥ ، ٢٣٠ ، ١٨٨ مستعمرة. فما هو عدد الخلايا فى كل جرام تربة جافة إذا علمت أن نسبة الرطوبة فى عينة التربة كانت ٣٥ ٪.

٤- أذكر بعض المجموعات البكتيرية التى يمكن تقديرها بطريقة العد بالأطباق.

٥- أذكر أسماء وأشكال بعض الفطريات التى تسود فى التربة الزراعية.

٦- أذكر بعض المجموعات البكتيرية التى تستخدم طريقة العد التقريبية دون غيرها فى عدها معللاً سبب ذلك.

٧- عند تقدير عدد بكتيريا الأزوتوباكتر فى عينة تربة خصبة تم الحصول على النتائج التالية :

التخفيف	$١٠^{-٢}$	$١٠^{-٣}$	$١٠^{-٤}$	$١٠^{-٥}$	$١٠^{-٦}$
عدد الأنابيب الموجبة	٤	٤	٢	١	صفر

بإستخدام جداول العد التقريبية (توجد بآخر الكتاب) قدر عدد الخلايا فى كل ١ جرام وزن جاف من التربة إذا علمت أن نسبة الرطوبة فى العينة ٢٨ ٪.

٨- قارن بين خصائص العقد الجذرية الصادقة والكاذبة التى تكونها بكتيريا الرايزوبيا على جذور النباتات البقولية .

٩- أذكر الخصائص التى تتميز بها مستعمرات الرايزوبيا المتكون على سطح بيئة الأجار.

١٠- ما هى خصائص خلايا الأزوتوباكتر وكيف يمكن الكشف عن نموهما على البيئة السائلة.

١١- لماذا يصعب عزل خلايا الأزوتوباكتر بحالة نقية علل ؟

١٢- ما هو الهدف من عملية البسترة التى تتم لتخفيفات التربة عند عزل بكتيريا الكلوستريديم.

١٣- ما هى فائدة المسمار الموضوع فى الأنبوبة وكذلك الفاسبار عند عزل بكتيريا الكلوستريديم من عينات تربة زراعية .

١٤- أذكر أسماء بعض الميكروبات الهوائية واللاهوائية المحللة للسليلوز.

١٥- ما الهدف من دراسة تكنيك روسى وكلودنى .

الدرس العملى الثانى والعشرون

ميكروبيولوجيا المياه

Water Microbiology

تلعب الكائنات الحية الدقيقة دوراً هاماً فى حياة الإنسان ، فمن المعروف أن أغلبها نافع والقليل منها ضار . ويعتبر علم الميكروبيولوجيا من العلوم التطبيقية بالدرجة الأولى نظراً لأنه يهتم بمجالات متعددة حيث يسهم فى تقدم مجالات علوم الاراضى والمياه والصناعات الغذائية والألبان والتخمرات الصناعية ومقاومة الأمراض والحشرات .

ويعتبر الماء من الأهمية بمكان لكل الكائنات الحية علي سطح الأرض، حيث أنه مصدر الحياة , لذلك قال الله تعالي في كتابه الكريم (وجعلنا من الماء كل شيء حي) صدق الله العظيم . والمياه التي هي مصدر الحياة يجب ألا يكون لها لون او طعم أو رائحة , ولكن إذا تطرق إليها التلوث فإن ذلك يسبب تغيراً في اللون أو الطعم أو الرائحة أو كل هذه الصفات وتستخدم المياه بصفة أساسية فى كل من الصناعات الغذائية والإستخدامات المنزلية الآدمية .

ويهدف هذا الدرس إلى تنمية قدرة الطالب على فحص المياه من الناحية الميكروبيولوجية قبل إستخدامها فى التصنيع الغذائى أو الإستهلاك الآدمى ، مع إعتبار أن هذه المياه جيدة وآمنة من الناحية الكيميائية . ولذلك يجب فى نهاية هذا الدرس أن يكون الدارس ملماً وعلى دراية كافية بكل مما يأتى:

١ – إجراء تعداد كلى للبكتيريا التي توجد في المياه.

٢– الكشف عن وجود ميكروبات ممرضة في المياه.

٣– معرفة مصدر البكتيريا الممرضة إن وجدت.

٤- الفرق بين أفراد بكتيريا القولون كدليل قاطع علي وجود البكتيريا المرضة ذلك فى محاولة لإيقاف نموها وتجنب أضرارها . وعن طريق الإختبارات السابقة يكون الدارس قادراً علي الحكم علي مدي صلاحية المياه ، ويصبح مؤهلاً للعمل فى أحد المعامل البكتيريولوجية المتخصصة فى الحكم على صلاحية المياه للإستهلاك الآدمى سواء فى محطات تنقية المياه أو فى مصانع الأغذية والألبان.

تدريب رقم (٦٠) : تقدير العدد الكلي لبكتيريا المياه

Determination of total bacterial count of water

يجرى هذا التدريب بهدف إكساب الدارس مهارة تقدير أعداد الخلايا البكتيرية الموجودة في عينة مياه سواء كانت مياه أنهار أو آبار أو ترع ، وكذلك إكسابه كيفية أخذ عينة المياه موضع التحليل بحيث تكون ممثلة للمصدر . ونتيجة هذا الإختبار تعطي صورة تقريبية إلي حد ما عن مدي تلوث هذا المصدر المائى ، كما تعطى للطالب فكرة واضحة عن أشكال البكتيريا الموجودة وذلك بعد فحصها ميكروسكوبياً مما يكسب الدارس خبرة جيدة للعمل فى محطات تكرير مياه الشرب وكذلك فى مصانع الأغذية والألبان .

شروط أخذ العينة :

يجب أن تكون العينة المأخوذة ممثلة تماماً للمصدر المائى المراد إختباره، مع ضرورة أخذ العينات تحت شروط التعقيم وسرعة إجراء التحليل حتى لا يتغير المحتوى الميكروبى للعينة بالزيادة أو النقص . وإذا تعذر ذلك فيجب أن تحفظ العينات فى الثلاجة على درجة حرارة ٥-١٠°م لحين إجراء التحاليل المطلوبة.

ويراعى عند أخذ العينات نوعية المياه المراد فحصها وإستخدام الطريقة الملائمة لأخذ العينة فإذا كانت العينة من ماء حنفية فيجب أن تعقم فوهة الحنفية باللهب أولاً ، ثم تترك مفتوحة لمدة ٥ دقائق قبل أخذ العينة . أما إذا كانت العينة من مياه طلمبات فيراعى ترك الطلمبة تعمل لفترة من الزمن (١٥ ق) للتخلص من المياه المخزنة قبل أخذ العينة . وإذا كانت العينة من مياه معاملة بالكلور فيجب إضافة مسحوق ثيوسلفات الصوديوم بمعدل ٠,٠٢ جرام / لتر لتتحد هذه المادة مع الكلور المتبقى بالمياه وتوقف تأثيره . وفى حالة ما إذا كانت عينة المياه مطلوبة من مياه جارية فيجب توجيه فتحة زجاجة جمع العينات لتكون عكس التيار ، أما إذا كانت العينة مطلوبة من مياه ساكنة فتؤخذ العينات من تحت سطح الماء لتجنب التلوث من المخلفات التى على السطح.

الأدوات والمواد المطلوبة:

زجاجة عينات معقمة تحتوى على عينة الماء المراد فحصها – أطباق بتري معقمه – أنابيب إختبار بكل منها ٩سم^٣ ماء معقم – ماصات سعة ١سم^٣ معقمة – بيئة أجارالجلوكوز ومستخلص الخميرة موزعة في أنابيب إختبار بواقع ١٠سم^٣ لكل أنبوبة إختبار.

خطوات العمل:

١ – رج العينة التي بالزجاجة رجاً جيداً ثم قم بعمل سلسله من التخفيفات العشرية كالمعتاد Decimal dilutions

٢ – خذ بماصة معقمه مبتدئاً بالتخفيفات العالية ١سم^٣ من كل تخفيف وضعه في طبق بتري معقم وذلك تحت شروط التعقيم.

٣ – سيح أنابيب بيئة الجلوكوز ومستخلص الخميرة وذلك باستخدام حمام مائي علي درجة ١٠٠°م ثم إتركها حتي تبرد دون أن تتجمد .

٤ – صب في كل طبق بتري من الأطباق السابقة أنبوبة من البيئة السابقة.

٥ – أترك الأطباق علي درجة حرارة المعمل بعد رجها بهدوء حتي تتجمد ثم توضع مقلوبة في الحضان علي درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

٦ – إفحص الأطباق فحصاً جيداً مستبعداً الأطباق التي تحتوي علي أعداد أقل من ٣٠ مستعمرة وتلك التي تزيد عن ٣٠٠ مستعمرة.

٧ – سجل أعداد المستعمرات في الأطباق التي تتراوح مستعمراتها ما بين ٣٠ – ٣٠٠ مستعمرة ثم أحسب المتوسط الحسابي لثلاث مكررات لكل تخفيف والذي يضرب بدورة في مقلوب التخفيف المستخدم لحساب عدد الخلايا في ١سم³ من العينة تحت الدراسة.

٨ – سجل نتائجك في جدول كالأتي :

التخفيف	المكررات	عدد المستعمرات النامية	الوصف المزرعي للمستعمرات	الفحص الميكروسكوبي: طريقة الصبغ المستخدمة	الفحص الميكروسكوبي: وصف الخلية
10^{-3}	R1 R2 R3	$\Sigma=$ $\overline{X}$			
10^{-4}	R1 R2 R3	$\Sigma=$ $\overline{X}$			
10^{-5}	R1 R2 R3	$\Sigma=$ $\overline{X}$			
10^{-6}	R1 R2 R3	$\Sigma=$ $\overline{X}$			

تدريب رقم (٦١) : التحليل القياسي للمياه Standard analysis of water

يجرى هذا التدريب بهدف إكساب الدارس مهارة الكشف عن تلـوث المياه حيث لا يعتبر الماء صالحا للشرب إلا إذا كان خاليـاً مـن البكتيريـا الممرضة . ونظراً لصعوبة الكشف عن هذه البكتيريا فـي الميـاه فـيمكن الكشف عن أفـراد مجموعـة القولـون وبـالأخص ميكروبـي *E. coli* و *Enterobacter aerogenes* . وهي التـي تتواجـد فـي أمعـاء الإنسـان والحيوان، وتصل للمياه مع الميكروبات الممرضة من مخلفات الإنسـان او الحيوان ، ووجودها في المياه يعتبر دليلاً على التلوث بمياه المجاري . لذلك يهدف هذا التدريب إلي الكشف عن تلوث المصدر المائي تحت الدراسة بمياه المجاري ويتم إختبار تلوث المياه بالمخلفات الأدمية أو الحيوانية بالكشف عن بكتيريا القولون Examination for coliform بـإجراء ثـلاث إختبـارات متتالية هى :

الإختبار الإحتمالى Presumptive test

فكرة الإختبار:

تعتمد فكرة هذا الإختبار على قدرة بكتيريا القولون على تخمير سكر اللاكتوز وإنتاج حامض وغاز خلال ٢٤ ساعة من التحضين علـى درجـة ٣٧°م بحيث يمثل الغاز نسبة ١٠٪ من حجم أنبوبة درهام . وفى هذه الحالة يعتبر الإختبار موجب وتكون العينة غير صالحة للشرب . وإذا لـم يتكـون غاز يعتبر الإختبار سالب وتكون العينة صالحة للإستخدام الآدمى . أمـا إذا تكون غاز بنسبة أقل من ١٠٪ من حجم أنبوبة درهام فيجب السماح للعينـة بالتحضين ٢٤ ساعة أخرى ، فإذا لم يتكون غاز بعد ٤٨ ساعة دل ذلك علي عدم التلوث وبالتالي صلاحية المياه للإستخدام الآدمى . أما فى حالة تكـون

غاز بأي نسبة بعد ٤٨ ساعة فتعتبر العينة مشكوكاً فيها Doubtful presumptive test ويجب أن يجري عليها باقي الإختبارات.

الأدوات والمواد المطلوبة:

عينة المياه المراد فحصها – ماصات معقمة سعة ١سم^3 – بيئة بويون اللاكتوز لإختبار التخمر موزعه في أنابيب إختبار بواقع ٧سم^3 لكل أنبوبه.

خطوات العمل:

١ – لقح أنابيب بيئة بويون اللاكتوز لاختبار التخمر بنقل ١سم^3 من عينة المياه لكل إنبوبة.

٢ – ضع الأنابيب في الحضان علي ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

٣ – إختبر الأنابيب لوجود غاز بعد فترة التحضين.

٤ – ضع الأنابيب في الحضان لمدة ٢٤ ساعة أخري إذا لم تعطي غاز يمثل ١٠٪ من حجم إنبوبة درهاد.

٥ – إذا لم يتكون غاز بعد ٤٨ ساعة تحضين تعتبر نتيجة الإختبار سالبة.

٦ – دون النتائج.

الإختبار التحقيقي Confirmatory test

فكرة الإختبار:

إذا كانت نتيجة الاختبار الإحتمالي السابق موجبة أو مشكوكاً فيها فيجب إجراء هذا الاختبار بستعمال بيئة أجار الإيوسين وأزرق الميثيلين Eosin methylene blue agar medium (EMB) وذلك بإضافة كمية معلومة من صبغة الإيوسين الحامضية وصبغة أزرق الميثيلين القاعدية إلي آجار اللاكتوز المغذي بعد ذلك تصب البيئة في أطباق بتري المعقمة ثم تترك فترة لتتصلب ثم تلقح الأطباق وتحضن علي ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة . بعد ذلك

تفحص الأطباق من حيث لون المستعمرات البكتيرية الناتجة ويلاحظ أن الميكروبات التي لا تخمر سكر اللاكتوز غالباً ما تكون شفافة علي هذه البيئة المغذية حيث أن الصبغة لا تمتص علي الخلايا .

الأدوات والمواد المطلوبة

أطباق بتري بها بيئة EMB – أنابيب الإختبار الإحتمالي التي أعطت نتيجة موجبة أو مشكوكاً فيها – مزارع نقية عمرها ٢٤ ساعة لكل من *E-coli* & *Enterobacter aerogenes*

خطوات العمل:

١ – قسم قاع طبق بتري المحتوي علي بيئة EMB إلي ثلاثة أقسام بإستخدام قلم ماركر.

٢ – لقح القسم الأول من المزرعة النقية لبكتيريا *E.coli* والقسم الثاني من المزرعة النقية لبكتيريا *E.aerogenes* بينما يلقح القسم الثالث بواسطة العينة الموجبة أو المشكوك فيها والناتجة من الإختبار الاحتمالي وذلك بطريقة التخطيط.

٣ – ضع الطبق مقلوباً في الحضان علي درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

٤ – إختبر المستعمرات الناتجة بعد فترة التحضين وقارن المستعمرات الناتجة في الجزء الملقح بالعينة المشكوك فيها مع مثيلتها من المستعمرات الناتجة من الأقسام الملقحة بالمزارع النقية.

٥ – دون النتائج ولاحظ أن :

أ- المستعمرات الممثلة لميكروب *E. coli* تتميز بأنها صغيرة الحجم ، ذات مركز أسود ولها لمعان معدنى مخضر.

ب- المستعمرات الممثلة لميكروب *E. aerogenes* تتميز بأنها أكبر حجماً، بنية المركز وليس لها لمعان معدنى.

٦- خذ جزء من كل مستعمرة من المستعمرات المختارة والممثلة لبكتيريا القولون ولقح بها بيئات أجار مغذي للحصول على مزارع مائلة من هذه الميكروبات بعد التحضين.

٧- يمكن إستخدام بيئة Endo agar بدلاً من بيئة EMB وفى هذه الحالة تكون مستعمرات *E. coli* على هذه البيئة ذات مركز غامق وتلون البيئة حولها بلون أحمر ذات لمعان معدنى . أما مستعمرات *E. aerogenes* فليس لها مركز غامق وتكون معتمة وردية اللون.

الإختبار التكميلي Completed test

فكرة الإختبار:

يجرى هذا الإختبار بغرض التأكد من أن الميكروبات التى ظهرت فى الإختبار التحقيقي وتم إختيارها كميكروبات ممثلة لبكتيريا القولون . التأكد من أن هذه الميكروبات تستطيع أن تخمر سكر اللاكتوز مرة ثانية وبأن لها نفس خصائص بكتيريا القولون حيث أنها بكتيريا عصوية قصيرة غير متجرثمة سالبة لصبغة جرام.

الأدوات والمواد المطلوبة:

الأطباق التي أعطت نتيجة موجبة من الإختبار السابق - أنابيب إختبار بها بيئة بويون اللاكتوز لإختبار التخمر - صبغه جرام - شرائح زجاجية - أنابيب بها أجار مغذي مائل .

خطوات العمل:

١ - لقح أنابيب بيئة بويون اللاكتوز لإختبار التخمر وذلك باستخدام المزارع المائلة الناتجة من الإختبار التحقيقى.

٢ – ضع الأنابيب بعد التلقيح في الحضان علي ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

٣ – من نفس المزارع المائلة السابقة حضر أغشية وإصبغها بصبغة جـرام وإفحصها بإستخدام العدسة الزيته المنغمسة.

٤ – يعتبر الإختبار موجب إذا رأيت عصويات قصيرة غير متجرثمة سالبة لجرام مخمرة لسكر اللاكتوز مع إنتاج حامض وغاز.

التفرقة بين أفراد مجموعة القولون :

Differentiation between coliform group members

نظراً لوجود تشابه كبير بين أفـراد مجموعـة القولـون وخاصـة *E. coli & Enterobacter aerogenes* في الصفات الظاهـرية لذا فإنه مـن الأهمية بمكان التفرقة بينهما من خلال بعض الإختبارات التي تعتمـد علـي بعض الخصائص الفسيولوجية للميكروب ويتم ذلك كما يلى :

إختبار إنتاج الإندول Indol production test

تدريب رقم (٦٢) : الكشف عن إنتاج الإندول

فكرة الإختبار :

تعتمد فكرة الإختبار على قـدرة ميكـروب *E. coli* علـى تحليـل الحامض الأمينى تربتوفان وتكوين مادة الإندول الطيارة والتى يمكن الكشف عنها بورقة مبللة بحمض الأكساليك حيث تعطي لونا أحمراً.

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزرعة سائلة نقية لميكروبي *E. coli* و *E. aerogenes* عمر ٢٤ ساعة – محلول حمض الأكساليك – أنابيب إختبار بهـا بيئـة مـرق التربتـون – قصاصات من ورق الترشيح .

طريقة العمل :

١ – لقح بيئة مرق التربتون بالميكروبات تحت الدراسة كلاً بمفرده.

٢ – ضع قصاصة مستطيلة الشكل من ورق الترشيح المبلل بحمض الأكساليك في أعلي أنبوبة الإختبار المحتوية علي البيئة بعد تلقيحها بحيث تكون معلقة بالسدادة القطنية.

٣ – ضع الأنابيب في الحضان علي ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

٤ – دون ما ترى من نتائج ملاحظا أى الأنابيب التى تتلون فيها ورقة الترشيح المبللة بحمض الأكساليك باللون الأحمر تكون موجبة والتى لا تتلون تكون سالبة .

٥– تعرف على الميكروب الذي يعطى نتيجة موجبة والميكروب الآخر الذي يعطى نتيجة سالبة وسجل النتائج .

إختبار أحمر الميثيل Methyl red test

تدريب رقم (٦٣) : الكشف عن تكون حامض

فكرة الإختبار :

تعتمد فكرة هذا الإختبار على قدرة ميكروب *E. coli* على تمثيل سكر الجلوكوز وتكوين كمية كبيرة من الحامض تغير لون دليل أحمر الميثيل، فى حين أن كمية الحامض المتكونة بواسطة ميكروب *E. aerogenes* تكون غير كافية لتغيير لون الدليل .

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزارع سائلة نقيه لكل من *E.coli* و *E.aerogenes* – أنابيب إختبار بها بيئة بويون الجلوكوز – محلول من دليل أحمر الميثيل .

خطوات العمل :

١ – قم بتلقيح أنابيب بيئة بويون الجلوكوز بكل ميكروب من الميكروبات موضع الدراسة مع ترك أنبوبة أخري للمقارنة.

٢ – ضع الأنابيب في الحضان علي ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

٣ – بعد التحضين أضف نقطتين من دليل أحمر الميثيل.

٤ – لاحظ أن تحول لون الوسط الغذائي إلي اللون الأحمر دليل على إيجابية الإختبار.

٥ – دون النتائج وإعرضها على مشرف الحصة لتأكيدها!.

إختبار الحلقة الحمراء Voges-Proskauer test (V.P)

تدريب رقم (٦٤) : الكشف عن مادة الأسيتيل ميثيل كاربينول

فكرة الإختبار :

يعتمد هذا الإختبار على قدرة ميكروب *E. aerogenes* على تكوين مادة أستيل ميثيل كاربينول Acetyl methyle carbinol (AMC) أثناء عملية التمثيل الغذائي ، بينما لا تستطيع أفراد الـ *E. coli* إنتاج هذا المركب.

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزارع سائله نقيه عمرها ٢٤ ساعة لميكروبي *E.coli* و *E.aerogenes* – أنابيب إختبار بها بيئة مرق الجلوكوز والفوسفات

والببتون – محلول ٤٠٪ مــن NaOH أو KOH – دليــل الألفــانفثول أو مسحوق الكرياتين .

خطوات العمل :

١- لقح أنابيب مرق الجلوكوز والفوسفات والببتون بكــل ميكــروب مــن الميكروبات موضع الدراسة مع ترك أنبوبة أخري للمقارنة.

٢- ضع الأنابيب في الحضان علي ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

٣- بعد فتره التحضين أضف ١سم³ من محلول NaOH وبضع نقط مــن دليل الألفانفثول أو الكرياتين .

٤- رج جيداً وأترك الأنابيب فترة تتراوح من ٢ – ٤ ساعات.

٥- دون النتائج مع ملاحظة تكون مادة الأسيتيل ميثيل كاربينول والتى تظهر فى صورة حلقة حمراء على سطح البيئة فى وجود المادة القلوية (NaOH) والهواء الجوى (CO_2) وعند توافر الألفانفثول والحمض الأمينى الأرجنين الموجودة فى البيئة الغذائية وذلك فى حالة النتيجة الموجبة.

إختبار تمثيل السترات Koser's test

تدريب رقم (٦٥) : الكشف عن تمثيل السترات

فكرة الإختبار :

تعتمد فكرة هذا الإختبار على قدرة ميكــروب *E.aerogenes* علــى إستخدام أملاح السترات كمصدر وحيد للكربون Citrate utilization ، بينما لا تستطيع أفراد *E.coli* النمو على هذه الأملاح نتيجة عدم قــدرتها علــى تمثيلها.

الأدوات والمواد المطلوبة:

مزارع سائله نقيه لميكروبي *E.coli* و *E.aerogenes* – أنابيب إختبار بها بيئة السترات السائلة .

خطوات العمل:

١- قم بتلقيح الميكروبات المذكورة في بيئة السترات.

٢- ضع الأنابيب في الحضان علي ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

٣- بعد فتره التحضين شاهد وجود نمو من عدمه.

٤- وجود النمو الميكروبي في صورة عكارة دليل إيجابية الإختبار.

٥- يمكن إجراء هذا الإختبار بإستخدام بيئة أجار السترات أى أجار مائل وظهور النمو علي سطح بيئة الأجار المائل يكون دليلاً على إيجابيه الإختبار.

أسئلة:

١ - إشرح كيف تقوم بتقدير العدد البكتيرى الكلى لعينة مياه مع ذكر المصدر .

٢ - وضح كيف تكتشف تلوث عينة مياه شرب بمصدر مياه مجارى من عدمه.

٣ - ما هى الفكرة الأساسية التى بنيت عليها كل من إختبارات الـ IMVIC؟

الدرس العملى الثالث والعشرون

ميكروبيولوجيا الألبان

Dairy Microbiology

يؤخذ العدد البكتيري الكلي Total bacterial count في عينة لـــبن كدليل هام علي ظروف إنتاجه وتداوله ومقدرتـــه علـــي الحفـــظ Keeping quality . وتعتبر زيادة الميكروبات باللبن الخام دليلاً علي تلوثـــه بدرجـــة كبيرة أثناء الإنتاج والتداول خاصة إذا ما تم تداوله بدون تبريد . هـــذا وقـــد يحتوي اللبن علي عدد كبير من البكتيريا دون أن يظهر عليه أي تغير غيـــر طبيعي لأن التغير لا يتم إلا إذا وصلت أعداد الميكروبات إلي حد معـــين . كذلك يعتبر نوع البكتيريا دليلاً مهماً علي تحديد مصدر التلوث ونوع الفساد. ويستهدف هذا الدرس تدريب الطالب على فحص عينة لـــبن مـــن الناحيـــة البكتيريولوجية من حيث أعداد البكتيريا والتغيرات التى تحدثها فى اللبن من خلال دراسة بيئة لبن عباد الشمس حتى يكتسب الخبرة التى تمكنه من العمل فى المعامل البكتيريولوجية بمصانع الألبان والمنتجات اللبنية . وعموماً يمكن فحص عينه لبن بكتريولوجياً كالأتي :

أولا: تقدير العدد البكتيري الكلى

Determination of total bacterial count

تدريب رقم (٦٦) : طريقة العد بالأطباق Plate count method

تعتبر هذه الطريقة شائعة الإستعمال لتـــوافر إمكانياتهـــا، وســـهولة إجرائها. وتجرى بنفس الطريقة التى سبق شـــرحها فـــى الـــدرس الســـابق

(ميكروبيولوجيا المياه) مع إستعمال عينة اللبن موضع الدراسة بدلاً من عينة المياه ، وكذلك إستخدام البيئة المناسبة. ولا تنمو جميع الميكروبات الموجودة فى اللبن بدرجة واحدة على درجة حرارة واحدة . لذلك فقد وجدت طريقة موحدة باستعمال درجة حرارة معينة وبيئة مناسبة لتقدير أعداد البكتيريا التى تنمو فى الظروف السابق ذكرها . وتستخدم هذه الطريقة لما لها من مزايا كطريقة معترف بها لتدريج اللبن وتحديد سعره بعد إنتاجه وكذلك منتجات الألبان الأخرى .

الأدوات والمواد اللازمة :

عينات مختلفة من اللبن – بيئة أجار مستخلص التربتون والجلوكوز Tryptone glucose extract agar (T.G.E.A) – لبن فرز معقم – أطباق بترى معقمة – ماصات معقمة – حمام مائى – أنابيب بها ٩ سم^3 محلول فسيولوجى معقم .

خطوات العمل :

١- ضع دورق بيئة أجار مستخلص التربتون والجلوكوز المتصلبة فى حمام مائى حتى تسيل . برد لدرجة ٤٥°م حيث يضاف اللبن الفرز المعقم بنسبة ١% وتخلط جيداً وتحفظ على هذه الدرجة .

٢- رج عينة اللبن المعطاه لك عدة مرات ثم إعمل التخفيفات تحت شروط التعقيم من ١/١٠ إلى ١/١٠٠٠٠٠٠ باستعمال المحلول الفسيولوجى أو الماء المعقم ثم خذ بماصة معقمة مبتدئاً بالتخفيفات العالية ١ سم^3 من كل تخفيف وضعه فى طبق بترى معقم فى ثلاث مكررات ثم صب حوالى ١٠ سم^3 من البيئة السابقة فى كل طبق مع مراعاة شروط التعقيم . كما يلاحظ رج البيئة جيداً بالأطباق حتى تمتزج تماماً وتتوزع بإنتظام .

٣- تقلب الأطباق بعد تمام تجمدها وتحضن على درجة ٣٠°م لمدة يومين .
وبعد فترة التحضين تعد الأطباق المحتوية على أعداد تتراوح بين ٣٠ ، ٣٠٠ مستعمرة باستعمال صندوق العد ثم يقدر المتوسط الحسابى للطبقين ويضرب × مقلوب التخفيف فيكون الناتج هو العدد فى ١ سم^{3} من العينة يراعى ذكر درجة حرارة التحضين في كل تجربة .

٤- يمكن تقدير الميكروبات المقاومة للحرارة Thermoduric باللبن وذلك بتسخين جزء من العينة فى أنبوبة إختبار معقمة على درجة ١٤٣°ف (٦٢°م) لمدة ١/٢ ساعة فى حمام مائى ثم تبرد الأنبوبة بسرعة فى ماء بارد ثم ترج جيداً ويعمل منها التخفيفات المناسبة وتوزع بالطريقة السابقة. عد الأطباق المناسبة ودون النتائج كعدد الميكروبات المقاومة للحرارة / ١سم^{3} من العينة مع ذكر درجة حرارة التحضين .

يلاحظ أن أهم مزايا هذه الطريقة أنها تعطى فكرة صحيحة عن عدد الميكروبات الحية فى اللبن كما يمكن عزل الميكروبات بحالة نقية وتعريفها. أما عيوبها فهى كثرة الأدوات المستعملة وطول الوقت اللازم للحصول على النتيجة . هذا علاوة على أنه لا توجد بيئة واحدة مناسبة لتنمية جميع المجموعات البكتيرية المختلفة مثل الميكروبات اللاهوائية والفطريات والخمائر وغيرها .

تدريب رقم (٦٧) : العد بالطريقة الميكروسكوبية المباشرة

Counting by direct microscopic method

الأدوات والمواد المطلوبة:

عينه لبن – شريحة ميكرومتريه – شريحة Breed – ماصة باستير ٠,٠١ سم^{3} ويمكن إستخدام ورق رسم بياني لتحديد مساحة ١سم^{2} علي شريحة

عادية عند عدم وجود شريحة Breed – ميكروسكوب ضـوئى – صـبغة أزرق الميثيلين – زيلول – كحول ٩٥٪

خطوات العمل:

١- إحسب مساحة الحقل الميكروسكوبي بعد تقدير قطره كما سبق شرحه.

٢- قدر عدد المجالات أو الحقول الميكروسكوبية والتى تسـمى بالمعامـل الميكروسكوبى التي يحتمل تواجدها فى مساحة ١سم٢ علـى الشـريحة العادية .

٣- خذ حجم معلوم من عينه اللبن تحت الدراسة قدره ٠,٠١ سم٣ وإنشـره جيداً علي مساحة ١ سم٢ على الشريحة العادية.

٤- أترك الغشاء ليجف هوائياً ولا تستخدم الحرارة فى التجفيـف حتـى لا يتشقق الغشاء ، ثم إغمس الشريحة فى كأس به زيول لمدة دقيقة لإزالـة حبيبات الدهن ثم أتركها لتجف هوائياً مرة ثانية.

٥- إغسل الشريحة فى كحول ٩٥٪ للتخلص من أثر الزيلول ثـم أتركهـا لتجف هوائياً أيضاً.

٦- إصبغ الغشاء بأزرق المثيلين لمدة ١ دقيقة ثم إغسـل بالمـاء وجفـف هوائياً.

٧- إفحص بالعدسة الزيتية المنغسة مقدراً أعداد البكتيريا فى حـوالى ٢٥ – ٣٠ حقل ميكروسكوبي ثم خذ المتوسط الحسابي وإضربه فـي المعامـل الميكروسكوبي ثم إضرب الناتج في مقلوب التخفيف المستخدم للحصـول على أعداد البكتيريا لكل١ سم٣ من عينة اللبن تحت الفحص .

ثانيا : دراسة تأثير البكتيريا علي اللبن

Action of microorganisms on milk

يعتبر اللبن غذاء كامل وبيئة صالحة لنمو أنواع كثيرة من البكتيريا إن لم يكن كلها لذلك تحدث فيه تغيرات كثيرة يمكن التعرف عليها من خلال بيئة لبن عباد الشمس.

تدريب رقم (٦٨) : التغيرات التى تحدثها البكتيريا فى بيئة لبن عباد الشمس

يجرى هذا التدريب بغرض تعريف الدارس بما تحدثه البكتيريا في اللبن كوسط غذائي مناسب لنمو البكتيريا وما هي التغيرات المختلفة التي تحدث والمظاهر المرئية التي من خلالها يستطيع الدارس الحكم علي مدى تلوث عينة اللبن ونوع الميكروب الملوث.

الأدوات والمواد المطلوبة:

أنابيب إختبار تحتوى على بيئة لبن عباد الشمس معقمة – مزارع نقية عمر ٢٤ ساعة لميكروبات تنمو فى اللبن وتحدث فيه بعض التغيرات مثل *E.coli* و *Bacilus subtilis* و *Streptococcus lactis* وغيرها.

خطوات العمل :

١– لقح الأنابيب بالميكروبات السابقة كل بمفرده وأترك واحدة للمقارنة.

٢– ضع الأنابيب في الحضان علي ٣٧°م لمدة أسبوع مع المتابعة اليومية للتغيرات التي قد تحدث.

٣– سجل النتائج التي تشاهدها فى جدول كالآتى :

الميكروب	قوام البيئة	نوع التجبن إنزيمى-حامضى	هضم الخثرة ولون الدليل	إختزال عباد الشمس	
				اللون	اليوم

هذا مع ملاحظة التغيرات التي تحدثها البكتيريا في اللبن كوسط غذائي من خلال بيئة لبن عباد الشمس كما يلى :

١- إنتاج حامض Acid production : حيث يحلل الميكروب النامى سكر اللاكتوز باللبن مع تكوين كمية من حامض اللاكتيك تكفى لتغيير لون الدليل من اللون البنفسجى إلى اللون الأحمر مع عدم تجبن اللبن .

٢- تجبن حامضي Acid clot : حيث تنتج كمية كبيرة من الحامض تخفض رقم الحموضة إلي ٤,٨ نتيجة للنشاط البكتيري مما يسبب تخثر للبن مع تغير لون الدليل إلي الأحمر وهذا التغير يكون غير مصحوب بشرش.

٣- تجبن حامضى مع هضم الخثرة Acid peptonization: حيث أن هضم الخثرة يجعل البيئة رائقة مع تكوين شرش وتغير لون الدليل إلى الأحمر وتسمى أيضاً ببتنة حامضية .

٤- تجبن حامضي مع إنتاج غاز Acid clot with gas production : ويتم هذا التغير بفعل بكتيريا القولون حيث يتحلل سكر اللاكتوز مع تكوين حامض وغاز وبذلك تنتج خثرة إسفنجية بها فقاقيع غازية .

٥- التجبن الإنزيمى Enzymatic clot : ينتج هذا التغير نتيجة نمو بكتيريا متجرثمة من جنس *Bacillus* تفرز إنزيم يشبه إنزيم الرينين

Renine like enzyme ولذا تتكون خثرة مصحوبة بشرش مع عدم تغير لون الدليل لعدم وجود حامض.

٦- إنتاج قلوية Alkali production : يحدث هذا التغير بسبب تحلل بروتين اللبن وإنتاج أمونيا تغير لون الدليل إلي اللون الأزرق.

٧- الببتنة القلوية Alkaline peptonization : وهنا يحدث هضم للخثرة بعد تكونها وتتحلل مكوناتها البروتينية مع تصاعد الأمونيا والتى تغير لون الدليل إلى الأزرق.

ثالثاً : إختبار جودة بسترة اللبن

تدريب رقم (٦٩) : إختبار الفوسفاتيز Phosphatase test

يجرى هذا الإختبار لأهميته حيث يتخذ إختبار الفوسفاتيز أساساً لمعرفة كفاءة البسترة . ويعتمد هذا الإختبار على قياس مقدار نشاط إنزيم الفوسفاتيز الذى يوجد عادة فى اللبن الخام والذى يهلك بعملية البسترة . ويدل وجود إنزيم الفوسفاتيز فى اللبن المبستر على عدم كفاءة عملية البسترة فإذا حضن لبن خام يحتوى على إنزيم الفوسفاتيز مع محلول Disodium phenyl phosphate فينفرد الفينول Free phenol الذى يمكن تقديره كمياً بواسطة صندوق مقارنة الألوان أو بأى طريقة حديثة بإستخدام جهاز HPLC مع وجود Standard .

الأدوات والمواد المطلوبة :

عينة لبن خام – عينة لبن مبستر وعينة لبن غير كامل البسترة – محلول منظم فوسفاتى phosphate buffer – محلول الكلوروفورم – دليل فولين

Folin-Ciocalteu`s reagent – محلول كربونات الصوديوم – جمام مائى – صندوق مقارنة الألوان – ماصات – أنابيب إختبار .

خطوات العمل :

١- حضر أنابيب أختبار كما يلى :

الأنبوبة الأولى تحتوى على ٠,٥ سم^{٣} لبن مبستر ، ١٠ سم^{٣} محلول منظم فوسفاتى .

الأنبوبة الثانية تحتوى على ٠,٥ سم^{٣} لبن غير كامل البسترة ، ١٠سم^{٣} محلول منظم فوسفاتى .

الأنبوبة الثالثة تحتوى على ٠,٥ سم^{٣} لبن خام ، ١٠سم^{٣} محلول منظم فوسفاتى.

الأنبوبة الرابعة تحتوى على ٠,٥ سم^{٣} لبن خام ، ١٠سم^{٣} ماء مقطر للمقارنة.

الأنبوبة الخامسة تحتوى على ١٠,٥ سم^{٣} محلول منظم فوسفاتى للمقارنة.

٢- أضف إلى كل أنبوبة ٣ نقط من محلول الكلوروفورم لوقف النشاط الميكروبى .

٣- أخلط الأنابيب جيداً وحضن على درجة ٣٧°م لمدة ١٢ ساعة .

٤- بعد فترة التحضين أضف إلى كل أنبوبة ٤,٥ سم^{٣} من كشاف Folin-Ciocalteu`s reagent المخفف وأخلط جيداً ثم أترك الأنابيب لمدة ٣ دقائق ورشح .

٥- أضف إلى المترشح ٢ سم^{٣} من محلول كربونات الصوديوم ثم ضعها فى حمام مائى يغلى لمدة دقيقتين ..

٦- يعتبر تركيز اللون الأزرق المتكون مقياساً أو تقديراً للفسفاتيز وفى العادة يقدر ذلك باستعمال صندوق مقارنة الألوان أو يقدر كمياً باستخدام جهاز HPLC .

٧- شاهد العرض الجانبى لهذه التجربة ثم دون النتائج فى جدول موضحاً المقارنة بين عينات اللبن المختبرة

٨- أكتب رأيك فى العينات .

تدريب رقم (٧٠) : دراسة بكتيريا حامض اللاكتيك

تقوم بكتيريا حامض اللاكتيك فى اللبن بتخمير سكر اللاكتوز مكونة خثرة حامضية (الزبادى) وأهم البكتيريا الموجودة بالزبادى هى :
Streptococcus lactis, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus
وكثيراً ما توجد عند فحص الزبادى بعض الخمائر ككائنات ملوثة له .

الأدوات والمواد المطلوبة :

لبن زبادى – بيئة Tween agar – بيئة أجار الجلوكوز وعصير الطماطم .

خطوات العمل :

١- إعمل غشاء من عينة الزبادى المعطاه لك وذلك بأخذ غمسة إبرة ونشرها على الشريحة الزجاجية ثم تجفيفها فوق مصباح كهربى . ثم ضع الشريحة فى وعاء به زيلول لمدة دقيقة لإزالة الدهن . ثم فى وعاء به كحول ٩٥ % لتثبيت الغشاء . ثم أغسل بالماء وأصبغه بطريقة جرام أو أزرق المثيلين .

٢- أفحص الغشاء بالعدسة الزيتية ودون ما تشاهده مع ملاحظة شكل الخلية ونظام التجمع - لاحظ وجود جراثيم من عدمه .

٣- لعزل ميكروبات حامض اللاكتيك تستعمل بيئة أجار الجلوكوز وعصير الطماطم وذلك لإحتوائها على المواد الغذائية اللازمة لنمو هذه الميكروبات . إذ أنها معقدة التغذية وهذه البيئة ليست منتقية إذ تظهر عليها الميكروبات الأخرى الموجودة باللبن. وقد تستعمل بيئة Tween agar المعروفة باسم Rogosa أو بيئة MRS وذلك لعزل ميكوزبات حامض اللاكتيك وهذه البيئات منتقية Selective media .

٤- إعزل بكتيريا حامض اللاكتيك من عينة الزبادى التى أمامك بطريقة الأطباق المصبوبة بإستخدام البيئات المتخصصة Rogosa - MRS .

٥- حضن الأطباق على درجة ٣٠°م لمدة ٤ أيام .

٦- شاهد وأوصف مجاميع بكتيريا حمض اللاكتيك التى تظهر بأشكال نجمية أو عدسية أو مستديرة دقيقة وأحياناً تكون تحت سطح الأجار ، أعمل منها غشاء وأصبغه بطريقة جرام وأوصفها .

٧- لقح بيئة لبن عباد الشمس بمجاميع بكتيريا حامض اللاكتيك التى ظهرت على الأطباق ثم حضن على درجة ٣٠°م لمدة أسبوع ولاحظ التغيرات التى تحدث فى هذه البيئة يومياً ودون النتائج .

٨- أفحص عينة اللبن الزبادى التى أمامك . وأجر عملية عزل ميكروبات حامض اللاكتيك التى بها كما سبق شرحه . دون النتائج التى تحصل عليها .

تدريب رقم (٧١) : تأثير درجة حرارة التخزين على نمو الميكروبات باللبن

تعتبر درجة الحرارة التى يحفظ عليها اللبن إحدى العوامل الهامة التى تحدد أنواع الميكرويات التى تنمو والتغيرات الناتجة . حيث أنه إذا حفظ اللبن على درجة حرارة المعمل فإنه يتخمر ويتجبن ولكن إذا حفظ جزء من هذا اللبن فى ثلاجة فمن المحتمل أن يحدث به فساد لزج Ropiness . وقد يحدث به تحلل بطئ للبروتينات وفى اللبن الذى يحفظ على درجة حرارة المعمل تنمو بكتيريا حامض اللاكتيك التى تمنع نمو معظم الميكروبات الأخرى . أما اللبن الذى يحفظ فى الثلاجة فإن بكتيريا حامض اللاكتيك وغيرها من الميكروبات تقف عن النمو بدرجة تسمح للميكروبات المحبة للبرودة المحللة للبروتين أو المسببة للفساد اللزج أن تنمو .

الأدوات والمواد المطلوبة :

عينة من اللبن الخام – صبغة أزرق المثيلين – سحاحة بها NaOH – دليل فينول فيثالين – زجاجات عينات معقمة .

خطوات العمل :

١- إعمل غشاء من عينة اللبن وأصبغه بالمثيلين الأزرق وأفحصه ميكروسكوبياً.

٢- قدر درجة الحموضة للبن باستخدام محلول NaOH .

٣- إملأ ٧ زجاجات عينات من اللبن التى أمامك وأقفلها ثم ضع واحدة من هذه الزجاجات على كل من درجات الحرارة الآتية : ٥ ، ١٠ ، ٢٠ ، ٣٠ ، ٣٧ ، ٤٥ ، ٥٥°م.

٤- إفحص كل زجاجة يومياً للتغيرات التى تحدث بـــاللبن وذلـــك بعـــد رج الزجاجة جيداً ، ثم أختبر للطعم والرائحة . أعمل غشاء من كـــل منهـــا يومياً . ولاحظ التغيرات التى تحدث فى اللبن وقارنها بالأغشية الســـابقة لها .

٥- بعد ٩ - ١٢ يوم قدر الحموضة للبن الموجودة فى كل زجاجة باستخدام NaOH .

٦- لاحظ أشكال وأنواع الميكروبات الموجودة فى الأغشية وارسمها . لاحظ تأثير درجات الحرارة المختلفة التى حفظ عليهـــا اللـــبن علـــى محتـــواه الميكروبي.

٧- ارسم الميكروبات التى تراها ثم أوصف شكل الخلايا ونظـــام التجمـــع ووجود خلايا متجرثمة من عدمه .

أسئلة :

١ - إشرح كيف تقدر أعداد بكتيريا اللبن بكل من طريقة الأطباق والطريقة الميكروسكوبية المباشرة.

٢ - وضح التغيرات المختلفة التى تحدثها البكتيريا فى اللبن كوسط غـــذائي من خلال بيئة لبن عباد الشمس.

٣- أذكر الأسماء العلمية لبكتيريا اللبن الزبادى مع توضيح خصائص كـــل منها.

٤- كيف تكشف عن جودة بسترة اللبن .

٥- وضح تأثير حرارة التخزين على نمو البكتيريا فى اللبن .

الدرس العملى الرابع والعشرون

ميكروبيولوجيا الأغذية

Food Microbiologgy

تعتبر المواد الغذائية عماد الحياة فهي التى نبنـــى منهـــا أجســـامنا ونحصل منها على الطاقة اللازمة للقيام بالوظائف الحيوية ، وهذه المواد قد تؤكل طازجة أو مطهية أو معاملة بمعاملات خاصة . وتوجد أنـــواع مـــن الميكروبات المختلفة على أو فى هذه المواد أو قد تجد طريقها إليها بوســـائل عديدة وأهم هذه الميكروبات البكتيريا والفطريات والخمائر . ولنوع الغـــذاء وخصائصه الطبيعية والكيماوية أهمية كبيرة فى تحديد نـــوع الميكروبـــات الموجودة به . وعليه لابد للقائم بالتحاليل الميكوبيولوجية للغذاء أن يكون على دراية كافية بنواحى تصنيعه المختلفة والكيفية التى يتم بها هذا التصنيع حتى يكون قادراً على تحديد مصادر التلوث ونوعه ويجب عليه مراعاة أن تكون العينة المأخوذة ممثلة لمراحل الإنتاج المختلفة فى مصانع الأغذيـــة وبـــذلك يكون قادراً على تفسير النتائج التى يحصل عليها . فى صـــناعة المعلبـــات تؤخذ عينة فى الـــ١٥ دقيقة الأولى من بداية التشغيل وفى الـــ١٥ دقيقـــة الأخيرة وفى نهاية التشغيل . ويكون مقدار العينة ١٢ علبة فى البداية وقبـــل النهاية ويحضن ثلث العينة على درجة ٣٠°م والثلث الأخر على درجة ٥٥°م لمدة ٣ أيام أما الثلث الثالث فيختبر مباشرة . ثم تفتح العلب وتـــدون درجـــة الحموضة واللون والرائحة ، ثم يبدأ العمل لمعرفة عدد الكائنات الحية الدقيقة ويستوجب ذلك إعداد المعمل لعملية العد . اما إذا كان الغذاء ســـائلاً فتؤخـــذ ١٢ عينة كل منها ١٠ سم^3 بطريقة تمنع التلوث أى تحت شـــروط التعقـــيم

وتقسم إلى ٣ أقسام ويحضن قسمين منهما على درجة ٣٠°م ، ٥٥°م لمدة ٤٨ ساعة ثم يفحص القسمان وتقارن النتائج بالقسم الذى تم إختباره ساعة أخذ العينة . أما الأغذية الجافة أوالمسحوقة فيؤخذ منها بملعقة إثنى عشر عينة من أماكن مختلفة ، ثم تخلط جيداً وتقسم إلى ٣ أقسام كل قسم يمثل أربع عينات ويفحص أحد الأقسام مباشرة . أما القسمين الآخرين فيضاف إليهما ماء للوصول إلى تركيز معين ومناسب تمهيداً لإجراء عملية العد .

تدريب رقم (٧٢) : إختبار الدقيق بكتيريولوجياً

Bacteriological examination of flour

اولاً : التعداد الميكروبى فى الدقيق :- Microbial count of flour

يحتوى الدقيق على أنواع عديدة من الميكروبات كالفطريات والخمائر والبكتيريا والأكتينوميسيتس ويتوقف كميتها على عوامل عديدة منها درجة الرطوبة ونظافة البذور المطحونة من مسببات الأمراض النباتية الفطرية والبكتيرية وتلوث الدقيق بالأتربة والحشرات ، وعادة توجد البكتيريا المتجرثمة بأعداد وفيرة نسبياً وذلك فى طور الجراثيم لعدم ملائمة الدقيق لنمو الأطوار الخضرية خاصة إذا ما كانت نسبة الرطوبة به قليلة .

الأدوات والمواد اللازمة :

أطباق بترى معقمة – ماصات ١سم^3 معقمة – ماء فسيولوجى معقم ٩ سم^3 – بيئة الأجار المغذى – بيئات عذائية بكتيرية – بيئات عذائية فطرية – بيئات عذائية لتنمية الخمائر.

طريقة العمل :

١- زن بدقة مقدار ١٠ جم من الدقيق الجاف ثم إنقلها إلى زجاجة تحتوى على ٩٠ سم٣ ماء معقم .

٢- رج جيداً ثم أجر التخفيف إلى ١ / ١٠٠٠ (10^{-3}).

٣- خذ من كل تخفيف ١ سم٣ وضعه في طبق بترى معقم وكرر ذلك ثلاث مرات ثم صب بكل طبق بيئة غذائية مما سبق ذكره بعد تسييحها وتبريدها إلى درجة ٤٥°م.

٤- حضن الأطباق على درجة ٣٠°م لمدة ٢٤ ساعة أو لمدة أسبوع في حالة الكشف عن الفطريات .

٥- عد المستعمرات الميكروبية النامية على الأطباق ثم قدر العدد الكلى فى الجرام الواحد وزن جاف . قسم الميكروبات النامية إلى بكتيريا – خميرة – فطريات . قسم البكتيريا إلى مجاميع تنتشر على سطح البيئة spreaders – بكتيريا ملونة ... ألخ . دون النتائج فى جدول .

ثانياً : تقدير عدد البكتيريا المتجرثمة Counting of bacterial spores

يمكن تقدير عدد البكتيريا المتجرثمة وذلك بتسخين التخفيفات السابقة على درجة ٨٠°م لمدة ١٥ دقيقة ، ثم زراعتها كما سبق وعدها بعد فترة التحضين . قدر عدد البكتيريا المتجرثمة فى عينة الدقيق التى أمامك ثم إنسبها إلى العدد الكلى للبكتيريا وذلك لكل ١ جم وزن جاف .

تدريب رقم (٧٣) : إختبار السكر والنشا بكتيريولوجياً

Bacteriological examination of sugar and starch

يستعمل السكر والنشا فى كثير من الصناعات الغذائية مثل الشربات والمربى والمثلوجات اللبنية وغيرها . ويراعى عادة أن يكون مثل هذه المواد ذات درجة عالية من الجودة البكتيريولوجية .

الأدوات والمواد اللازمة :

عينة من السكر – عينة من النشا – أطباق بترى وماصات ودوارق معقمة – بيئة أجار الجلوكوز المغذى فى زجاجات مفلطحة – بيئة مرق الجلوكوز ومستخلص الخميرة – بيئة أجار الجلوكوز والتربتون المحتوى على دليل بروموكريزول بربل – مرق الكبد المغذى – أجار الببتون والحديد – ماء معقم .

أولاً : الكشف عن الميكروبات الميزوفيلية Detection of mesophiles

١- زن مقدار ١٠ جم من السكر أو النشا ، ثم إنقلها إلى زجاجة معقمة ، أضف ماء معقم حتى تصل إلى ١٠٠ سم^3 مع الرج ، إستعمل هذا التخفيف (10^{-1}) فى الآتى:

٢- رج جيداً ثم أجر التخفيف إلى ١ / ١٠٠٠ (10^{-3}).

٣- لقح أنبوبتين من مرق الجلوكوز ومستخلص الخميرة ذات الرقم الأيدروجينى ٤,٥ وذلك باستخدام محلول ١% من حمض اللاكتيك بمقدار ٥ سم^3 من التخفيف السابق . حضن على درجة حرارة المعمل لمدة أسبوع ثم إفحص ميكروسكوبياً للخميرة .

٤- لقح زجاجتين مفلطحتين Bottle plates تحتوى كل منهما على ٢٠ سم^{٣} أجار الجلوكوز المغذى ذات الرقم الإيدروجينى ٤,٥ بواسطة ٣ سم^{٣} من محلول ١% حمض لاكتيك معقم بمقدار ٥ سم^{٣} ، ١ سم^{٣} من التخفيف السابق . وحضن كما سبق مع ترك الزجاجة خلال فترة التحضين على جانبها المفلطح ثم إختبر الفطريات . لاحظ مجاميع الفطر المختلفة وإختبرها ميكروسكوبيا مع رسم شكل الجراثيم التى تراها ونظام تفرع الميسليوم الفطرى .

٥- يوضع ١سم^{٣} من التخفيف السابق فى طبق بترى معقم ثم صب عليه الأجار المغذى ويحضن ثم تعد المجاميع البكتيرية . إختبر المجموعات الناتجة المتجرثمة.

٦- لقح أنبوبة محتوية على أجار الجلوكوز المغذى والمبرد على ٥٠°م بمقدار ١سم^{٣} من التخفيف السابق ثم إتركه يجمد وغطى بمقدار ٣/١ بوصة أجار تركيز ٣% معقم . حضن على درجة المعمل لمدة أسبوع أو على درجة ٣٧°م لمدة ٢ يوم . لاحظ نمو الميكروبات اللاهوائية .

٧- دون النتائج التى تحصل عليها فى جدول .

ثانيا : الكشف عن البكتيريا الثيرموفيلية Detection of thermophiles

من التخفيف السابق لكل من السكر والنشا خذ حوالى ٢٠ سم^{٣} فى أنبوبة معقمة ثم بسترها بوضعها فى حمام مائى على درجة ٨٠°م لمدة ١٥ دقيقة ثم أجرى الإختبارات الآتية :

جراثيم البكتيريا المسببة للفساد الحامضى المستتر spores Detection of flat scur

لقح كل من زجاجتين مفلطحتين محتويتين علـــى أجـــار الجلوكـــوز والتربتون والمضاف إليه دليل بروموكريزول بربل بمقدار ٢سم٣ من تخفيف السكر أو النشا المبستر . ثم حضن على درجة ٥٥°م لمدة ٣٦-٤٨ ساعة ثم إفحص المستعمرات الصفراء ذات المركـــز الغـــامق dark center yellow colonies محاطة بهالة صفراء yellow zone .

الكشف عن جراثيم الميكروبات اللاهوائية المحبة للحرارة العالية والغير منتجـــة لغـــاز H_2S

Detection of thermophilic anaerobic spores not producing H_2S

لقح ٦ أنابيب من بيئة مرق الكبد المغذى حيث تسخن البيئـــة قبـــل التلقيح فى حمام مائى بالغليان لطرد الهواء الذائب بها ثم تبرد قبـــل التلقـــيح مباشرة بمقدار ٢ سم٣ من تخفيف السكر أو النشا السابق تحضيره لكل أنبوبة ثم صب طبقة سمك ٢ سم أجار سايح (٣%) فوق سطح البيئة على درجـــة ٤٥°م لجعل الوسط لاهوائى وذلك بعد أن يجمد بيئة الأجار . إرفع درجـــة حرارة الأنابيب إلى ٥٥°م فى حمام مائى ثم حضن على ٥٥°م لمـــدة ٣-٥ يوم . إختبر لوجود غاز ورائحة الجبن . إعمل غشاء من أنبوبة بهـــا نمـــو إيجابى وإصبغه بطريقة جرام وإفحصه ميكروسكوبياً ثم دون ما تشاهده .

الكشف عن جراثيم الميكروبات اللاهوائية المحبة للحرارة العالية والمنتجة لغـــاز H_2S المسببة للفساد الكبريتى

Detection of thermophilic anaerobic spores producing H_2S

لقح ٦ أنابيب من بيئة أجار الببتون والحديد بمقدار ٢ سم٣ من تخفيف السكر أو النشا السابق تحضيره مع الرج ثم حضن الأنابيب على درجة ٥٥°م

لمدة ٣-٥ أيام . عد المستعمرات ذات اللون الأسود Black colonies والمحاطة بهالة سوداء Black zone فى الأنابيب الستة . إنتشار اللون الأسود بالبيئة يرجع إلى تكوين كمية كبيرة من H_2S.

تدريب (٧٤) : إختبار الطماطم والبطاطس بكتريولوجيا

Bacteriological examination of tomatos and potatoes

الأدوات والمواد المطلوبة :

ثمار طماطم حديثة القطف - درنات بطاطس حديثة الجمع - أنابيب بكل منها ٩ سم^3 ماء معقم - أطباق بترى معقمة - بيئة أجار الجلوكوز ومستخلص الخميرة - مشرط حاد .

أولاً : الفحص الميكروبيولوجى لسطح ثمار الطماطم والبطاطس

١- إقطع بمشرط معقم حاد مقدار ٥ سم^2 من بشرة الطماطم أو البطاطس من جانبين وما يلاصقها من أنسجة .

٢- إسحق النسيج المقطوع فى هون صينى معقم مستعملاً رمل معقم .

٣- إنقل النسيج المهروس ١٠ سم^2 بما فيه من رمل إلى زجاجة معقمة تحتوى على ٩٠ سم^3 ماء معقم ثم رج جيداً (10^{-1}) .

٤- إعمل التخفيفات المناسبة ١/١٠٠ ، ١/١٠٠٠ ، ١/١٠٠٠٠ من التخفيف السابق ثم إنقل ١سم^3 من كل تخفيف فى طبق بترى معقم وصب عليه بيئة أجار الجلكوز ومستخلص الخميرة .

٥- حضن الأطباق على درجة ٣٠°م لمدة ٢-٣ يوم.

٦- عد المستعمرات الميكروبية الناتجة فى أطباق بعد التحضين ثم إحسبها فى ١ سم٢ من السطح الخارجى للثمرة .

٧- إفحص المستعمرات للبكتيرية والفطرية ومستعمرات الخمائر الأكتينوميستات ... دون النتيجة فى جدول .

ثانياً : الفحص الميكروبيولوجى للنسيج الداخلى

Micobiological examination of inner tissues

١- ثمار الطماطم

أ- يبلل السطح الخارجى للطماطم بالكحول ٩٥% ثم أشعله بغرض تعقيم السطح الخارجى حيث يسهل تعقيم السطح الخارجى للطماطم لأنه أملس .

ب- أثقب النسيج الخارجى بإستعمال ماصة ١٠سم٣ معقمة ثم إسحب بها مقدار ٥ سم٣ من العصير والمكونات الداخلية .

ج- إنقل ١سم٣ من العصير فى كل من أنبوبتين محتويتين على أجار الجلوكوز ومستخلص الخميرة بعد إسالتها وتبريدها إلى ٤٥°م .

د- صب كل أنبوبة فى طبق بترى معقم مع الرج الرحوى لتوزيع اللقاح .

هـ- حضن الأطباق على درجة ٣٠°م لمدة ١-٢ يوم ولاحظ نمو الميكروبات من عدمه فى البيئة.

و- دون النتائج التى تحصل عليها .

٢- درنات البطاطس

من الصعب تعقيم السطح الخارجى للبطاطس لأنه خشن ويوجد على سطحه بقايا التربة نظراً لوجود الدرنة عادة بها وذلك عكس الطماطم .

إحرق بواسطة مصباح بنزن السطح الخارجي لدرنة بطاطس ملساء متوسطة الحجم ثم بواسطة مشرط معقم إقطع الدرنة ثم خذ جزء من النسيج الداخلى وإنقله سريعاً إلى طبق بترى معقم . كرر ما سبق ذكره مع الطماطم.

تدريب (٧٥) : الإختبار البكتريولوجى للبيض

Bacteriological examination of eggs

يوجد على سطح البيض كثيراً من الميكروبات مثل الفطريات والبكتيريا وأهم البكتيريا التى توجد على قشرة البيض هى بكتيريا *E.coli* فهى توجد على كل بيضة . كما توجد على البيض كثيراً من الأتربة التى تحمل ميكروبات كثيرة مثل العصويات القصيرة السالبة لجرام .

أما محتويات البيض السليم من الداخل فهى خالية من الميكروبات sterile ولكن كثيراً ما تنتقل الميكروبات من القشرة إلى الداخل عن طريق ما بها من مسام إذا ما بللت بالماء .

الأدوات والمواد المطلوبة :

بيض طازج نظيف – بيض محفوظ فى الثلاجات – أنابيب بها بيئة مرق مغذى – صبغة جرام – بيئة ماكونكى سائلة – بيئة اللحم – أجار المولت – بيئة E.M.B – بيئة أجار الدم – محلول فسيولوجى وماء معقم .

خطوات العمل

١ – تحضير البيض للإختبار Preparation of eggs for examination

إغسل البيض فى ماء باستعمال الفرشاة ثم إغمر البيض فى محلول السليمانى ١/١٠٠٠ لمدة ٢ دقيقة . إغسل فى ماء معقم . إعمل ثقب فى الغلاف الكلسى الخارجى بواسطة مشرط حاد معقم .

٢- إختبار البيض الطازج Examination of fresh eggs

خذ بماصة معقمة مقدار من البياض ولقح بها أنبوبة تحتوى على بيئة مرق مغذى . كرر ما سبق فى أنبوبة أخرى ثم إخلط جيداً كل أنبوبة . خذ ١ سم٣ من بيئة المرق المغذى الملقح ولقح أنبوبة أخرى ثم خذ من الثانية ١ سم٣ ولقح أنبوبة ثالثة من بيئة المرق المغذى . كرر ما سبق أيضاً على صفار البيض بعد عمل ثقب فى الطرف الآخر والتخلص من كل البياض .

٣- إختبار البيض المحفوظ Examination of preserved eggs

خذ ١سم٣ من البياض ولقح به أنبوبة بها بيئة مرق مغذى . كرر ما سبق لكل من البياض والصفار . حضن أنابيب بيئة المرق المغذى الملقحة وذلك على درجة ٣٠°م لمدة ٢ يوم . شاهد الأنابيب ثم اعمل غشاء من الأنابيب التى أعطت نتيجة موجبة ثم إصبغه بصبغة جرام ثم أوصف الميكروبات التى تشاهدها .

تدريب رقم (٧٦) : تقدير العدد الكلى Counting of total bacteria

١- إخلط البيض السائل جيداً باستعمال ملعقة معقمة .

٢- زن مقدار ١٠ جم من محتويات البيض وإنقلها إلى زجاجة بها ٩٠ سم٣ من محلول فسيولوجى فيكون التخفيف ١/١٠ ثم رج جيداً .

٣- إعمل التخفيفات المناسبة مستعملاً محلول فسيولوجى معقم إلى أن يصل إلى تخفيف ١/١٠٠٠٠ (10^{-4}) .

٤- ضع ١سم٣ من كل تخفيف فى طبق بترى وأضف إليه بيئة الأجار المغذى ثم حضن على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .

٥- عد المجاميع البكتيرية النامية ثم قدر عدد الميكروبات فى الجرام الواحد من البيض المستعمل فى الفحص .

تدريب (٧٧) : تقدير بكتيريا القولون Detection of coliform bacteria

لقح كل تخفيف من التخفيفات السابقة فى خمسة أنابيب بها بيئة ماكونكى السائلة المحتوية على أنبوبة درهام . حضن على درجة ٣٧°م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة ثم إختبر لوجود حامض وغاز وقدر عدد ميكروبات القولون فى الجرام الواحد باستعمال جدول العد التقريبى Most probable number . للتأكد من وجود ميكروبات القولون ، لقح بطريقة التخطيط على بيئة E.M.B. دون نتائجك موضحاً عدد ميكروبات القولون فى الجرام الواحد . وللتأكد يمكن إجراء الإختبارات التحقيقية الأخرى كإختبار الأندول وأحمر الميثيل ، V.P وإختبار السترات . يمكن إجراء الإختبار لوجود أنواع أخرى من الميكروبات خاصة الممرضة منها وذلك باستخدام بيئة أجار الدم مثل

-B Hemolytic *Sterptococcus* and *Staphylococcus*

تدريب (٧٨) : إختبار اللحم والسمك بكتريولوجياً

Bacteriological examination of meat and fish

اللحم والسمك من المواد الغذائية سريعة الفاسد فهى تعتبر البيئة المثلى لنمو الميكروبات التعفنية التى تحدث تغيرات ضارة بمحتويات اللحم والسمك البروتينية مصحوبة بروائح كريهة . وتلعب الميكروبات الهوائية واللاهوائية دوراً هاماً فى فساد اللحوم والأسماك . لذلك يهدف هذا الإختبار إلى فحص الميكروبات الموجودة على السطح الداخلى والخارجى لقطعة اللحم أوالسمك

الأدوات والمواد المطلوبة :

قطعة لحم كبيرة مكعبة الشكل – سمك نيلي – سمك بحرى – سكين ومشرط حاد – أنابيب تخفيف بها ٩ سم^3 ماء معقم – أطباق بترى معقمة – أنابيب بيئة الأجار المغذى العميق – أنابيب بيئة الجيلاتين المغذى – هون صغير – أنابيب بيئة لبن عباد الشمس .

خطوات العمل :

١- زن مقدار ١ جم من الجزء الخارجي لقطعة اللحم أوسمك على مسطح بلاستيك .

٢- زن ١ جم من اللحم من الجزء الداخلي وكذلك من السمكة ولكي تحصل على قطعة لحم أو سمك من الداخل ، يقطع اللحم أو السمك بسكين حاد معقم ثم يقطع الجزء المطلوب فحصه ١ جم من الداخل بسرعة بسكين آخر معقم وتحت شروط التعقيم .

٣- ضع كل وزنة في هون معقم يحتوى على رمل ثم إسحق جيداً وبسرعة باستعمال يد هون معقم وتحت شروط التعقيم .

٤- إنقل اللحم أو السمك المسحوق وكذلك الرمل المصاحب لها إلى زجاجة تحتوى على ٩٩ سم^3 ماء معقم ثم رج جيداً فيكون التخفيف ١/١٠٠ (10^{-2}) .

٥- إعمل تخفيفات مناسبة عادة ١/١٠٠٠ (10^{-3}) لعد الميكروبات في الجزء الداخلي . إعمل تخفيفات ١/١٠٠٠ ، ١/١٠٠٠٠ لعد الميكروبات في الجزء الخارجي ثم صب ثلاثة أطباق من كل تخفيف . وذلك لإمكانية تحليل النتائج إحصائياً .

٦- أفحص المستعمرات الناتجة وسجل الصفات المزرعية . ثم أفحص ميكروسكوبياً وسجل شكل الخلايا ونظام التجمع وكذلك وجود ميكروبات متجرثمة من عدمه .

تدريب (٧٩) : الفحص البكتريولوجى للأغذية المعلبة غير الفاسدة

Bacteriological examination of unspoiled canned foods

تختبر الأغذية المعلبة بكتيريولوجيا من حيث تمام جودة التعقيم for sterility وكذلك للقدرة على الحفظ for keeping quality ويجرى معرفة جودة التعقيم بأخذ عينة منها مباشرة وفحصها بكتيريولوجياً . أما قدرتها على الحفظ فيجرى هذا الإختبار بتحضين العلب وهى مقفلة فترة من الزمن ولإجراء هذه الإختبارات يتطلب الآتى :

الأدوات والمواد المطلوبة :

أغذية معلبة - بيئة أجار الجلوكوز والتربتون المحتوية على دليل بروموكريزول بربل - بيئة أجار الببتون والحديد - بيئة اجار المولت - أطباق بترى معقمة.

إختبار جودة التعقيم Test for sterility

أولاً : إختبار الخضراوات المعلبة Examination of canned vegetables

تحضير العينة :

١- تفتح العلبة تحت شروط تعقيم . بعد تعقيم الفتحة باللهب أو بأى وسيلة أخرى تستخدم فتاحة بعد تعقيمها فى اللهب وتفتح بها العلبة فى هذا المكان المعقم وبعد عملية الفتح تغطى العلبة بغطاء طبق بترى معقم .

٢- إنقل ١٥ جم من الغذاء أو ١٥ سم^{٣} من العصير ، ويستعمل ماصة معقمة ذات نهاية متسعة لنقل السوائل كما يستعمل ملعقة أو spatula معقمة لنقل الأغذية الصلبة أو النصف صلبة . ويستعمل كذلك قضيب زجاجي معقم لإدخال العينة إلى أنبوبة إختبار معقمة .

خطوات العمل :

١- تخلط المادة الغذائية مع مثل حجمها من الماء المعقم خلطاً جيداً قبل التلقيح وترج جيداً يوزع ١٥ سم^{٣} أو ١٥ جم منها على ٣ أنابيب من البيئات الغذائية . إستعمل واحدة أو أكثر من البيئات الآتية للكشف المتخصص كالآتى :

أ- بيئة أجار أو مرق الجلوكوز والتربتون المحتوى على دليل بروموكريزول بربل وذلك لإختبار وجود الميكروبات المحدثة للفساد الحمضى المستتر flat sour .

ب- بيئة مرق الكبد المغذى لإختبار وجود الميكروبات المحللة للبروتينات والمحدثة لحالات الإنتفاخ بالعلب .

ج- بيئة أجار البيتون والحديد لإختبار الميكروبات المسببة للفساد الكبريتى .

٢- حضن مجموعة من الأنابيب على درجة ٣٧°م وأخرى على ٥٥°م لمدة ٧٢ ساعة ثم إختبر للنمو وكذلك مكان النمو فى الأنبوبة .

٣- سجل ما تحصل علية من نتائج مع ملاحظة الخصائص المزرعية للميكروبات النامية على كل بيئة غذائية .

٤- إفحص ميكروسكوبياً الميكروبات المختلفة مع تسجيل شكل الخلايا ونظام التجمع ووجود الجرثومة من عدمه .

ثانياً : إختبار الأغذية المعلبة الحامضية Examination of acid canned foods

يجرى هذا الإختبار بغرض معرفة مدى جودة التعقيم أو وجود البكتيريا التى تسبب فساد الغذاء الحامضى فى المعلبات مثل الفاكهة المعلبة Compot .

تحصير العينة : يتبع ما سبق شرحه فى الخضراوات .

خطوات العمل :

أ- وزع ١٥ سم^{٣} أو ١٥ جم من العينة على ٥ أطباق بترى معقمة بالتساوى ثم صب بيئة أجار المولت ثم حضن على درجة ٣٠°م لمدة ٧٢ ساعة . ثم عد المستعمرات النامية للميكروبات المحبة للحموضة . ويدون النتائج التى تحصل عليها .

ب- وزع ١٥ سم^{٣} أو ١٥ جم فى أنابيب من كل من البيئات التالية : مرق الجلوكوز والتريبتون المحتوى على دليل بروموكريزول بربل . مرق الكبد المغذى مع وضع طبقة من الأجار المعقم فوق سطح البيئة السائلة ، ثم حضن ثلاث أنابيب من كل بيئة على درجة ٣٧ °م لمدة ٤٨-٧٢ ساعة، ٣ أنابيب أخرى على درجة ٥٥°م لمدة ٤٨ ساعة . إبحث عن الميكروبات المسببة للفساد الحمضى المستتر والميكروبات اللاهوائية المحبة للحرارة . والميكروبات اللاهوائية المحللة للبروتينات .

ج- يراعى إذا كانت المادة تحتوى على جزء أخر صلب يؤخذ عينة من السائل كما سبق وكذلك من الصلب باستعمال ملقط معقم . ثم يجرى ما سبق شرحه فى أ ، ب.

الدرس العملى الخامس والعشرون

الفحص البكتيريولوجى للأغذية المعلبة

Bacteriological Examination of Canned Foods

تدريب رقم (٨٠) : إختبار طبيعة العلب

١- دون كل ما على العلبة من بيانات وعلامات تجارية . بعد نزع البطاقة Lable التى على العلبة دون ملاحظتك عن العيوب الظاهرية للعلبة مثل الصدأ أو عدم قفل العلبة بإحكام .... ألخ . قسم العلب حسب شكلها الظاهرى إلى : Flat, flipper, springer, soft swell or hard swell

إذا كانا سطحى العلبة مستقيمين أو مقعرين يمكن قياس التفريغ باستعمال جهاز خاص . أما إذا كان سطحى العلبة منتفخين فيمكن جمع الغاز وتحليله .

٢- أغسل العلبة جيداً . بالماء والصابون . يمكن إستعمال مذيب خاص مناسب للتخلص من الدهن الذى قد يوجد على سطح العلبة . إذا كان كل من سطحى العلبة مستقيماً ، عرض سطح العلبة الذى سيفتح إلى اللهب مع تحريك العلبة حتى تتوزع الحرارة بإنتظام فيها . فى حالة ما إذا كان بالعلبة كمية بسيطة من الغاز فإنه يتمدد ويسبب إنتفاخاً ظاهرياً بالعلبة ثم إفتح العلبة . أما فى حالة ما إذا كان سطحى العلبة منتفخين فلا تعرض العلبة للهب ولكن يتم التعقيم للسطح بواسطة محلول سليمانى ١/١٠٠٠ لمدة ثوانى . ثم يجفف السطح بفوطة معقمة ثم بواسطة محلول كحول ٦٠

% ثم تفتح العلبة . عند فتح العلبة يراعى وضع فوطة معقمة حول الفتاحة قبل عمل الثقب الأول فى العلبة .

٣- أزل أحد سطحى العلبة ثم فرغ محتوياتها ثم نظفها جيداً . أختبر بدقة للثقوب الدقيقة ، أو اللحام غير الجيد ، الصدأ ، وجود تلوين غير عادى وذلك بغرض اختبار العلب بعد تفريغ محتوياتها .

الإختبارات الميكروبيولوجية لمحتويات العلبة

تدريب (٨١) : الأغذية القليلة والمتوسطة الحموضة المعلبة

يعتبر الفول والبسلة واللحوم والذرة أمثلة لمثل هذه الأغذية

١- بعد فتح العلبة يؤخذ ١٠ سم^{3} أو ١٠ جم حسب نوع الغذاء وقوامه ويضاف إلى ٩٠ سم^{3} ماء معقم ليتكون تخفيف ١٠/١ ثم تعمل تخفيفات مناسبة من هذا التخفيف .

٢- يلقح من التخفيفات السابقة أنابيب إختبار تحتوى على البيئات الغذائية الآتية :

أ- أجار الجلوكوز والتربتون المضاف إليه دليل البروموكريزول بربل وترج جيداً ثم تترك لتتصلب ثم حضن على درجة ٥٥°م لمدة ٤٨ ساعة ثم تفحص المستعمرات المسببة للفساد الحمضى المستتر flat sour وهو ميكروب *B. thermoacidurans* . إعمل غشاء منها وأصبغه بجرام وأفحص ميكروسكوبياً . لاحظ شكل الخلية ونظام التجمع .

ب- مرق الجلوكوز المغذى وتحضن بعض الأنابيب على ٣٧°م والأخرى على ٥٥°م لمدة ٤٨ ساعة . لاحظ التغيرات التى تحدث . حضر غشاء وأصبغه بجرام وأفحص ميكروسكوبياً لوجود ميكروب

C. thermosaccharolyticum المسبب للفساد الناتج عن البكتيريا اللاهوائية المحبة للحرارة والغير منتجة لغاز H_2S . لاحظ شكل الخلية ونظام التجمع .

ج- أجار البيتون والحديد المبردة إلى ٤٥°م ثم تخلط جيداً . يراعى إضافة ٣% أجار معقم على سطح البية لجعل الظروف لا هوائية . ثم تحضن الأنابيب على درجة ٥٥°م لمدة ٤٨ ساعة . إختبر المستعمرات المكونة لهالة سوداء وهى *C. nigrificans* التى تسبب الفساد الكبريتى ، حيث أنها تنتج غاز H_2S .

د- مرق الجلوكوز المغذى مع التحضين على درجة ٣٧°م وأخرى على درجة ٥٥°م لمدة ٤٨ ساعة . ونلاحظ التغيرات التى تحدث بكل أنبوبة خاصة فى الأغذية البروتينية مثل البسلة – واللحوم :ختبر للبكتيريا الميزوفيلية المسببة للتعفن Putrifaction كما تلاحظ الروائح الكريهة الناتجة . ويفحص غشاء لوصف الميكروب المسبب لهذا الفساد ميكروسكوبياً مع ملاحظة شكل الخلية ونظام التجمع .

تدريب (٨٢) : الأغذية الحامضية المعلبة

فساد غير بيولوجى :

وفيه يحدث إنتفاخ العلب نتيجة لوجود لغاز الإيدروجين كما فى حالة العلب المعبأة بالكرنب المخلل أو الطماطم أو غيرها من الأغذية الحامضية وفيها يجمع الغاز فى أنبوبة وهو يتكون أساساً من CO_2 ، H_2 .

الفساد البيولوجى Flat saur :

تتبع نفس الطريقة الموضحة فى حالة الكشف عن ميكروب *B. thermoacidurans* فى بيئة أجار الجلوكوز والتربتون المحتوى على دليل البروموكريزول بربل .

الفساد الناتج عن الخمائر :

يلاحظ مظهر ورائحة محتويات العلبة ثم اعمل غشاء واصبغه بطريقة الصبغ البسيط باستخدام صبغة أرزق المثيلين . إفحص الغشاء ميكروسكوبياً . شاهد الميكروبات ولاحظ شكل الخلية وتكهن باسم الميكروب. دون نتائجك مع التوضيح بالرسم لأشكال الميكروبات فى كل حالة .

تدريب (٨٣) : عد البكتيريا المتجرثمة الهوائية

Counting of aerobic spore-formers

يجرى هذا الإختبار بغرض تنمية مهارة الطالب على كيفية عد هذا النوع من البكتيريا والتى تقاوم عمليات البسترة وكذلك تقاوم درجات الحرارة العالية المستخدمة فى عمليات التصنيع الغذائى . وهى تستطيع أيضاً النمو على درجات حرارة ٣٠-٣٥°م . لذلك لابد عند إجراء عملية العد فى أى عينة غذائية لابد من معاملة العينة حرارياً بتعريضها على ٨٠°م لمدة ١٥ ق ذلك للقضاء على الميكروبات الأخرى التى لا تتحمل الحرارة Mesophiles غير المتجرثمة ثم تبرد إلى درجة حرارة المعمل ثم يجرى عمل التخفيفات المناسبة وتزرع فى أطباق على درجة حرارة ٣٠°م لمدة ٢٤ ساعة . بفحص المستعمرات النامية ميكروسكوبياً نجد أنها عصوية طويلة متجرثمة وموجبة لجرام . تعد المستعمرات وترجع أهمية هذه الميكروبات فى

مقاومتها للمعاملات الحرارية التى تتم فى بعض عمليات التصنيع الغذائى حيث تنمو فى المادة الغذائية أثناء فترة الحفظ والتى تسمى بفترة Shelf period حتى فى ظروف الثلاجة . وهذا يسبب تغيرات غير مرغوبة فى المادة الغذائية نتيجة نموها وإنتاج مركبات كيماوية مسئولة عن الرائحة الكريهة وفساد الغذاء .

تدريب (٨٤) : عد البكتيريا المتجرثمة اللاهوائية

Counting of anaerobic spore-formers

يجرى هذا التدريب لزيادة مهارة الدارس على كيفية عد هذا النوع من البكتيريا وذلك بإتباع نفس خطوات التدريب السابق مع تنمية العينة فى أطباق ثم تحضن فى إناء لاهوائى Anaerobic jar يسمى Anaero Jar حيث يحتوى هذا الإناء على مادة تسمى Anaerogen (AG 25, Oxoid) من شأنها إمتصاص O_2 من حيز الإناء لجعل الظروف لاهوائية وبذلك ينمو الميكروب فى صورة مستعمرات. تعد المستعمرات وتنسب إلى ١ جم مادة غذائية جافة . كذلك يمكن تنمية الميكروب اللاهوائى فى أنابيب ثم يجرى عملية العد بطريقة العدد الأكثر إحتمالاً Most probable number (MPN). وأهمية هذه المجموعة من البكتيريا لا تقل أهمية عن تلك التى وردت فى التدريب السابق .

تدريب (٨٥) : عد البكتيريا المحبة للحرارة العالية

Counting of thermophilic bacteria

يجرى هذا التدريب لزيادة مهارة الدارس فى عد تلك المجموعة من البكتيريا والتى تنمو بحالة مثلى على درجة حرارة تصل إلى ٦٠°م فأكثر.

حيث تنمو بنشاط على درجة ٦٢°م (١٤٢ ف) مثل *Bacillus stearothermophilis* أو *Streptococcus thermophilus* – *Clostridium* sp. ويمكن عد هذه البكتيريا بتحضين الأطباق على ٥٥°م فأكثر . تعد المستعمرات الناتجة وتنسب إلى واحد ١ جم وزن جاف من العينة تحت الدراسة.

تدريب (٨٦) : عد البكتيريا المحبة للبرودة

Counting of sycrophilic bacteria

يجرى هذا التدريب لتعريف الطالب بكيفية عد البكتيريا المحبة للبرودة والتى تنمو فى درجة حرارة الثلاجة وتفسد المواد الغذائية حيث تنمو على ١٥°م فأقل . ويمكن عد هذه البكتيريا بتحضين الأطباق على ٥°م لمدة أسبوع مع متابعة النمو يومياً . تعد المستعمرات الناتجة وتنسب إلى ١ جم مادة غذائية جافة .

تدريب (٨٧) : عد الفطريات والخمائر Counting of molds and yeasts

يجرى هذا الإختبار لتعريف الطالب كيفية عد كل من الفطريات والخمائر حيث لها أهمية عظمى فى الكشف عن مدى نظافة المادة الغذائية سواء فى مرحلة المواد الخام ، أو أثناء الإنتاج أو النقل والتداول وكذلك فى فترة الحفظ . وتستعمل فى هذه الحالة بيئة البطاطس والدكستروز ذات رقم الحموضة المنخفضة حيث يصل إلى pH ٣,٥ . عند هذه الدرجة يثبط نمو البكتيريا التى تفضل الوسط المتعادل Mesophiles . بعد فترة التحضين ٤٨ – ٧٢ ساعة يتم عد المستعمرات الناتجة وفحصها ميكروسكوبياً .

الدرس العملى السادس والعشرون

الفساد الميكروبى للأغذية

Microbial Spoilage of Foods

توجد عادة على المواد الغذائية الغير مجهزة (الخام) ميكروبات عديدة مثل البكتيريا والفطريات والخمائر كما قد تتلوث الأطعمة المجهزة بهذه الميكروبات أيضاً . تسبب هذه الميكروبات فساد الأغذية ويتوقف الفساد على نوع الميكروب المسبب وتركيب المادة الغذائية وخواصها الطبيعية والظروف المحيطة بها ، وغيرها من العوامل التى تحدد نوع الميكروب المسبب للفساد عادة .

فساد الفواكه والخضراوات Spoilage of fruits and vegetables

تدريب رقم (٨٨) : فساد الفاكهة

الأدوات والمواد المطلوبة :

عينات سليمة وتالفة من التفاح والعنب والبرقوق والبرتقال – مشرط حاد – سكينة حادة – بيئات بكتيرية – بيئات فطرية – ميكروسكوب – شرائح زجاجية – أغطية

خطوات العمل :

١- إختبر ظاهرياً وميكروسكوبياً كل من العينات التالفة بأخذ جزء من الفطر النامى ثم ضعه على شريحة زجاجية وأضف إليه نقطة أو أكثر من محلول الجلسرين ١٠% وغط بغطاء الشريحة ثم إفحصه بالعدسة

الصغرى والكبرى ولاحظ شكل الميلسليوم والكونيديات . إستنتج اسم الجنس للفطر النامى .

٢- خذ بواسطة إبرة معقمة قليل من الفطريات النامية ثم إزرعها على بيئة أجار المولت . حضن الأطباق على درجة حرارة المعمل لمدة ٧ أيام ثم أفحص المجاميع النامية من حيث شكلها ودرجة نموها وقدرتها على تغيير لون البيئة .

٣- أ : خذ تفاحة سليمة ثم لقح أحد جوانبها بعد تعقيمه بالكحول وتعريضه للهب بالفطر المعزول من التفاح الفاسد فى الخطوات السابقة مع الإحتفاظ بتفاحة أخرى سليمة بدون معاملة للمقارنة .

ب : حضن التفاحة الملقحة فى المعمل ثم إختبر على فترات لفسادها لاحظ ما إذا كان الفساد مشابه ذلك الذى حدث بالتفاح الفاسد المعطى لك والمعزول منه الفطر .

٤- أعصر عينات العنب والبرقوق ، الفاسد المعطى لك ثم أعمل منها عشاء وأفحصه ميكروسكوبياً بالعدسة الزيتية .

٥- لاحظ نوع الميكروب النامى مع رسمه ووصفه مع ذكر نظام تجمع الخلايا البكتيرية الموجودة . أوصف شكل الميسليوم الفطرى ونظام تفرعه .

تدريب (٨٩) : فساد الخضراوات

ترجع أسباب فساد الخضروات إلى إرتفاع نسبة الرطوبة بها وكذلك تأثير فعل إنزيمات الخضراوات ذاتها على الأنسجة ، تواجد الفطريات ، هذا علاوة على وجود البكتيريا المسببة للعفن الطرى مثل بكتيريا

Erwinia carotovora . كذلك نمو البكتيريا المتجرثمة بين الخضراوات المتكدسة المبللة، لاحظ نوع الفساد وسببه فى الخضراوات المعطاه لك.

الأدوات والمواد المطلوبة :

عينات من الخضراوات الورقية ، القرنية والدرنية – مشرط حاد– سكين حاد – بيئات بكتيرية وفطرية – ميكروسكوب – شرائح زجاجية – أغطية شرائح

خطوات العمل :

١- الخضراوات الورقية : مثل الخس – السبانخ ... أعمل غشاء من الأجزاء الفاسدة من العينات التالفة المعطاه لك .

٢- أصبغه بطريقة جرام وبين أشكال الميكروبات النامية ونتيجة الصبغ مع الرسم واستنتج اسم الميكروب المسبب للفساد إن أمكن مع ذكر شكل الخلايا ونظام التجمع.

٣- الخضراوات القرنية : مثل الفول والبسلة والفاصوليا . اتبع ما سبق ذكره فى الخضراوات الورقية .

٤- الخضراوات الدرنية : مثل البطاطس والبطاطا والجذر واللفت والفجل . اتبع ما سبق ذكره فى الخضراوات الورقية . مع ملاحظة ما إذا كان الفساد ناتجاً عن البكتيريا المسببة للعفن الطرى أو عن الفطريات .

٥- من العينات التى درستها إزرع فى بيئة غذائية بكتيرية مثل بيئة الأجار المغذى وأخرى تزرع فى بيئة غذائية فطرية مثل بيئة المولت .

٦- لاحظ بعد فترة التحضين ٢٤ ساعة للبكتريا و٧ أيام للفطر شكل النمو ولون المستعمرات النامية بالأطباق .

٧- إرسم وأوصف شكل الخلية البكتيرية ونظام التجمع .

٨- إرسم وأوصف شكل الميسليوم الفطرى ونظام التفرع .

الدرس العملى السابع والعشرون

فساد المخللات

Spoilage of Pickles

ضع كمية من المخلل ، الخيار أو اللفت مثلاً فى وعاء زجاجى وضع كمية من المحلول الملحى تكفى لتغطية نصف الثمار . قدر الحموضة فى المحلول الملحى بطريقة التعادل ثم افحص ميكروسكوبياً . أوصف وارسم الخلايا وأذكر نظام التجمع .

حضن المخلل فى المعمل لعدة أسابيع ثم قدر الحموضة على فترات بطريقة التعادل مع القلوى Neutralization . لاحظ التغيرات التى تطرأ على المحتوى الميكروبى والحموضة وقوام المخلل . من الطبيعى أن تلاحظ نموات على المخلل من الفطريات والخمائر وهذه هى التى تعمل على تقليل الحموضة ومن ثم تعمل على تلفه . مما ينتج عنه أحد أنواع الفساد المختلفة .

تدريب (٩٠) : لزوجة المخلل

إختبر عينة من المخلل الموجود به الفساد اللزج ظاهريا وميكروسكوبياً ودون ما تشاهده . لاحظ شكل خلايا البكتيريا ونظام التجمع .

تدريب (٩١) : إسوداد المخللات

شاهد عينة من المخللات السوداء وبين أسباب هذه الظاهرة . إعمل غشاء من المحلول الملحى ولاحظ وجود ميكروبات من جنس الكلوستريديم المتجرثم مثل *C. nigrificans* وهى تعمل على تكوين غاز H_2S الذى

يتفاعل مع أملاح الحديد الموجودة فى المحلــول الملحــى مســبباً إســوداد المخللات وتظهر هذه الحالة أيضاً فى الكرنب المخلل .

الدرس العملى الثامن والعشرون

التسمم الغذائى

Food Poisoning

تحدث عملية تلوث الغذاء بأنواع مختلفة من البكتيريا أو الفطريات . نتيجة هذا التلوث تحدث عملية التسمم الغذائى لأنواع معينة من الغذاء بأنواع معينة من البكتيريا أو الفطريات . مثل بكتيريا *Clostridium botulinum* التى تنمو فى ظروف لاهوائية مثل ما يحدث فى عملية التفسيخ والتى يتسبب عن نموها التسمم البوتشولينى نتيجة إفراز نوع معين من السم Toxin وكذلك حدوث التسمم الغذائى العنقودى الذى تسببه بكتيريا *Staphylococcus aureus* . هذا بالإضافة إلى حدوث أعراض الإصابة بالسموم الفطرية مثل سموم الأفلاتوكسينات والتى يسببها فطر *Aspergillus flavus* .

تدريب (٩٢) : الكشف عن التسمم البتشولينى Botulism

يجرى هذا التدريب بغرض زيادة مهارة الطالب فى عملية الكشف عن وجود السم المسئول عن التسمم البوتشولينى وذلك لما له من أهمية من ناحية الصحة العامة .

الأدوات والمواد المطلوبة :

عينة غذاء ملوث مثل الفسيخ – جهاز طرد مركزى – مرشح بكتيرى – حيوان تجارب .

خطوات العمل :

١- حضر مستخلص من العينة موضع الدراسة أو من سائل التفسيخ .

٢- قم بعملية الطرد المركزى للحصول على الراشح المحتوى على السم.

٣- إحقن ١/٢ مل من الراشح فى جسم حيوان تجارب أو خلط ٥ مل من الراشح بغذاء حيوان التجارب .

٤- فى حالة وجود السم بتركيز عالى نجد أن حيوان التجارب قد مات بعد ٤٨ – ٧٢ ساعة.

٥- قم بعمل تشريح لحيوان التجارب ثم سجل الأعراض الظاهرية على الأعضاء الداخلية .

٦- جهز شريحه من دم الحيوان ومن الأعضاء التى تميزت بأعراض مرئية.

٧- أوصف شكل الخلايا التى تراها مع الرسم . لاحظ وجود الجرثومة ثم حدد مكانها بالخلية .

تدريب (٩٣) : الكشف عن التسمم الغذائى العنقودى Food poisoning

يهدف هذا التدريب إلى زيادة مهارة الطالب في عملية الكشف عن التسمم الغذائى العنقودى نظراً لما له من أهمية عظمى فى حياة الإنسان .

الأدوات والمواد المطلوبة :

عينة غذاء ملوث مثل الجاتوه أو التورتة – أنابيب إختبار بها ماء معقم – ماصات معقمة – ماء معقم – خلاط كهربى – بية أجار الدم – بيئة أجار المانيتول – بيئة Staph. 110 .

خطوات العمل :

١- لقح بيئة أجار الدم في أطباق بترى بواسطة التخطيط من تخفيفات عينة الغذاء تحت الدراسة .

٢- حضن الأطباق على ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة

٣- لاحظ وجود المستعمرات المحللة للدم

٤- لقح أطباق بترى المحتوية على بيئة أجار المانيتول بواسطة ٠,١ مل من التخفيف المناسب ثم وزعها بإنتظام على السطح بواسطة ساق زجاجية منحنية معقمة .

٥- حضن الأطباق على ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .

٦- عد المستعمرات صفراء اللون الناتجة على الأطباق بعد فترة التحضين .

٧- يلاحظ أن السلالات المحللة للدم تحاط بمنطقة صفراء حول المستعمرات بينما تحاط السلالات الغير محللة بمنطقة حمراء .

٨- يمكن تلقيح بيئة Staph. 110 للكشف عن تخمير السانيتول وتحليل الجيلاتين حيث تحضن الأطباق على ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .

٩- عد المستعمرات الملونة الناتجة عن نمو الميكروب العنقودى وذلك بإضافة دليل بروموكريزل بربل الأرجوانى حيث أن تغير اللون يثبت تخمر المانيتول.

١٠- صب فى الطبق ٥ مل من محلول كبريتات الأمونيوم المشبع لإختبار تحليل الجيلاتين .

١١- حضر شريحة وأصبغها بصبغة جرام لفحصها ميكروسكوبيا . أوصف وارسم مع ملاحظة شكل الخلية ونظام التجمع .

تدريب (٩٤) : الكشف عن التسمم الغذائى السلمونيلى Salmonelosis

قد يحدث التسمم الغذائى للإنسان نتيجة عدوى غذائية Food infection من تناول أغذية ملوثة بميكروبات عصوية قصيرة سالبة لجرام . لذلك يهدف هذا التدريب إلى زيادة مهارة الطالب فى عملية الكشف عن مثل هذه الحالات الخطيرة نتيجة تناول الغذاء الملوث ويمكن للدارس الكشف عن هذا التلوث بعدة طرق كالآتى :

أ- العزل المباشر للميكروب المسبب Direct isolation

وذلك بإستخدام بيئة غذائية متخصصة مثل مستنبت SS agar مع وجود سلاله نقية من الميكروب المسبب *Salmonella typhimurium* للمقارنة بالمستعمرات الناتجة والمعزولة من العينات تحت الدراسة .

ب- طريقة التنشيط Enrichment method

تمزج عينة وزنها ٥٠ جم من الغذاء الملوث مع ٥ مل من إحدى البيئات المتخصصة مثل مرق تتراثيونيت أو مرق السلينايت أو مرق بويون اللاكتوز وبعد التحضين على ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة يتم الكشف عن الميكروب كالآتى:

١- العد باستعمال بيئات غذائية متخصصة .

٢- الفحص الميكروسكوبى .

٣- مقارنة النتائج بسلالة نقية للمقارنة .

٤- إجراء إختبارات فسيولوجية .

٥- تغذية حيوان تجارب وتسجل الأعراض وتفحص الإفرازات مع عمل تشريح للنافق منها .

ج- التشخيص المعملى **Lab. exanination**

يجرى هذا الإختبار على عينات معينة مأخوذة من إنسان حدث له تسمم سلمونيلى Salmonelosis كالآتى :

أ- عمل مزرعة لعينة قئ أو براز على مزارع متخصصه .

ب- يجرى إختبارات بيوكيميائية للمستعمرات الناتجة .

ج- يجرى تحليل لعينة دم المريض .

تدريب (٩٥) : الكشف عن السموم الفطرية **Detection of aflatoxins**

ترجع أهمية هذا الإختبار إلى أن بعض الفطريات تنتج هذه السموم فى بعض المواد الغذائية مثل الفول السودانى وحبوب القمح والبن . وتعتبر خطورة هذه السموم أنها تسبب السرطان وتشوه الأجنة كما أنها تسبب طفرات لبعض الكائنات الأخرى فى نفس البيئة . كذلك يهدف هذا الإختبار إلى تعريف الطالب كيفية الكشف عن هذه السموم الخطيرة بطريقتين مختلفتين إحداهما تحليلية والأخرى بيولوجية .

١- ففى الطريقة التحليلية يمكن إستخلاص السم بالمذيب العضوى المناسب وذلك من الأغذية الملوثة ثم يقاس التركيز بأحد الطرق المستخدمة مثل GLC – HPLC –TLC وذلك فى وجود standard لتحديد تركيز السم بالضبط .

٢- أما الطريقة البيولوجية فيكشف بها عن تأثير هذه السموم علـــى بعــض الكائنات الحية تحت ظروف معملية حيث يجــرى الإختبـــار باســـتخدام البكتيريا – الأرانب – حيوانات التجارب – الفئران – كتاكيت صـغيرة – بط صغير . بعد ذلك تحسب نسبة النفوق الناتجة مع التركيزات المختلفــة مع ملاحظة نسبة التشوهات الواضحة مقارنة بالكنترول . هــذا ويجــب ملاحظة أن النتيجة المتحصل عليها تختلف بإختلاف طريقة إضافة الســم حيث تستخدم طرق مختلفة كالآتى :

1- Tntraperitonial injection

2- Intravenous injection

3- Subcutanous injection

4- Oral feeding

الدرس العملى التاسع والعشرون

حفظ الأغذية

Preservation of Food

يؤثر ملح الطعام على نمو الميكروبات الموجودة عادة بالأغذية حيث يستعمل الملح أو محاليل مركزة منه كمادة حافظة ويرجع ذلك إلى الضغط الإسموزى العالى الذى يسبب بلزمة خلايا الميكروبات ولقد ذكر كثير من الباحثين أن تركيز ١٠% ملح يوقف نمو ميكروب التسمم البشوليني . تحتاج بعض الميكروبات لنموها إلى نسبة عالية من الملح وتسمى Halophilic bacteria وعموما يعتبر محلول ١٥ % ملح كاف لحفظ الكثير من الأطعمة.

تدريب (٩٦) : استعمال ملح الطعام كمادة حافظة

خطوات العمل :

١- لقح بيئة مرق الجلوكوز ومستخلص الخميرة المحتوية على التركيزات الآتية :

١ ، ١٠ ، ١٥ ، ٢٠ ، ٢٥ % NaCl بحوالى ١سم^{3} من معلق الميكروبات الآتية :

E. coli, B. subtilis, P. fluorescens, S. cerevisiae and Aspergillus niger.

٢- حضن الأنابيب على درجة حرارة المعمل لمدة ٧-٩ يوم ثم اختبر لنمو الميكروبات . وضح ذلك بعلامة (+) دلالة على كمية النمو فى كل أنبوبة.

الحفظ بالتخليل :

يستعمل التخليل لحفظ بعض الخضراوات كالكرنب والخيار واللفت والجزر وغيرها ولحفظ بعض الفواكه كالزيتون والمانجو الخضراء والبلح الأخضر والبطيخ الأخضر الصغير ويعمل حامض اللاكتيك المتكون مع نسبة الملح المرتفعة على حفظ الخضراوات من التلف وذلك لإيقاف نمو الميكروبات التعفنية والضارة.

تدريب (٩٧) : الكرنب المخلل Saurkrout

الأدوات والمواد المطلوبة :

كرنبة صغيرة – ملح طعام – أطباق بترى معقمة – بيئة أجار الجلوكوز وعصير الطماطم – صبغة أزرق المثيلين – محلول NaOH ١/٢ ع – ماصات معقمة – أوعية زجاجية كبيرة – بيت أجار الجلوكوز ومستخلص الخميرة .

خطوات العمل :

١- تخلص من الأوراق الخارجية والفاسدة والجزء السفلى من الساق .

٢- إغسل ما تبقى من الكرنب بماء الحنفية .

٣- قسم الكرنبة لنصفين .

٤- زن كل نصف بعد تقطيعه إلى شرائح صغيرة وضعه فى وعاء مع مزجها بالملح الجاف بنسبة ٢,٥ % بالوزن وذلك ليستخدم محتويات أحد الوعائين لأخذ العينات .

٥- إضغط الأوراق جيداً مع الإحتراس من تكسيرها حتى لا يتلف مظهرها، ضع عليها ثقل ثم غط الوعاء بشاش .

٦- إحفظ على درجة حرارة ٧٠-٧٥ ف حتى يصير صالحا للإستعمال .

٧- إفحص المخلل الناتج كما يلى :

أولاً : دراسة المخلل أثناء التخمر

تؤخذ عينات من السائل على فترات ويختبر فى كل مرة على النحو التالى :

١- ميكروسكوبياً : إعمل غشاء من سائل التخليل وأصبغه بالميثيلين الأزرق وافحصه ميكروسكوبيا وإوصف وارسم ما تشاهده .

٢- تقدير الحموضة بطريقة التعادل بالقلوى : أضف إلى ١٠ سم^3 من السائل مقدار ١٠ سم^3 من الماء المقطر . أغلى لكى تطرد غاز CO_2 . ثم أضف نقطة أو إثنين من دليل الفينول فيثالين ثم قدر الحموضة باستعمال محلول NaOH . إحسب النسبة المئوية للحامض محسوبا على أساس حامض لاكتيك حسب المعادلة الآتية :

$$\text{النسبة المئوية لحامض اللاكتيك} = \frac{\text{سم}^3 \times \text{عيارية } NaOH \times ١}{\text{سم}^3 \text{ من العينة}}$$

ثانياً : اختبار الناتج النهائى

١- ظاهرياً : يلاحظ الطعم واللون والقوام والرائحة .

٢- ميكروسكوبياً : يقدر عدد الميكروبات فى المخلل الناتج بطريقة بريد Breed وذلك باستخدام طريقة الميكروسكوب المباشرة مع الصبغ بطريقة جرام . ويعد بصفة خاصة خلايا الخميرة وفحص هيفات الفطر . ويدل

وجود أعداد كبيرة من الخميرة أو الفطريات على رداءة النوع وعدم جودة المخلل نظراً للتلوث بهذه الميكروبات .

٣- **العد بطريقة الأطباق** : قدر عدد الميكروبات بطريقة الأطباق مع استعمال أجار الجلوكوز وعصير الطماطم . إفحص الأطباق لمستعمرات بيضاء كبيرة أو قشدية اللون (الخميرة) . أو المستعمرات الصغيرة الملونة ووجود هذين النوعين يدلان على رداءة النوع وعدم الجودة وذلك لإنخفاض تركيز الملح والحمض الناتج أو لعدم التحكم في الظروف اللاهوائية .

تدريب (٩٨) : الخيار المخلل Pikled cucumbers

طريقة العمل :

ضع خيار صغير الحجم بعد غسله بمياه الحنفية في محلول ملحي قوته ٤٠ سالوميتر Salometer مع إضافة ٩ جم ملح جاف لكل ١٠٠ جم خيار ثم :

١- احتفظ بجزء من هذا الخيار على درجة حرارة المعمل مدة ثمانية أسابيع تقريباً مع إضافة محلول ملحي مركز أو ملح جاف إلى الخيار لكي تزيد من التركيز بمقدار ٤ سالوميتر أسبوعياً حتى تصل إلى ٥٠ سالوميتر . ثم بمقدار ٢ سالوميتر أسبوعياً حتى تصل إلى ٦٠ سالوميتر .

٢- احتفظ بالجزء الآخر في ثلاجة بعد إضافة محلول ملحي مركز أو ملح إلى أن تصل ٦٠ سالوميتر . ثم قسم هذا الجزء إلى قسمين قبل بدء الدرس العملي بأسبوع.

أ : جزء يستمر حفظه في الثلاجة .

ب : قسم يحضن على درجة حرارة المعمل لمدة أسبوع قبل الدرس ثم إختبر الأقسام الثلاثة السابقة للآتى :

١- اللون – الرائحة – الطعم – القوام – وذلك يعمل قطاع عرضى وتقدر الحموضة فى المحلول الملحى بالتعادل مع القلوى مع تقدير النسبة المئوية للحامض على أساس حامض لاكتيك .

٢- قدر درجة تركيز المحلول الملحى مستخدماً السالوميتر .

٣- عد الميكروبات بطريقة الميكروسكوب المباشرة ، أو بطريقة الأطباق .

٤- دون النتائج التى تحصل عليها ثم علق عليها من وجهة نظرك .

الملاحق

ملحق رقم ١

البيئات الغذائية

Cultivation media

بيئة البويون المغذى (المرق المغذى) **Nutrient broth medium**

مستخلص لحم ٣ جرام

ببتون ٥ جرام

ماء حنفية لتر

الـpH ٧,٠.

بيئة بويون السكريات لإختبار التخمر **Suger broth medium**

يضاف إلى لتر من بيئة المرق المغذي الآتى :

٥ جرام من السكر المراد استخدامه.

١ سم^3 من دليل البروموثيمول بلو.

إضبط درجة الـpH عند ٧,٠ ثم وزع البيئة في أنابيب بمعدل ٧ سم^3 لكل أنبوبة ضع بداخل كل أنبوبة أنبوبة درهام Durham tube مقلوبة لإختبار تكون غاز.

بيئة لبن عباد الشمس **Litmus milk medium**

لتر من اللبن الفرز الطازج مضاف إليه ٥ سم^3 من دليل عباد الشمس (٥٪).

بيئة الأجار المغذى **Nutrient agar medium**

إضف ١٥-٢٠ جم أجار أجار إلى ١ لتر من بيئة المرق المغذى.

إغلى المخلوط على حمام مائى حتى تمام ذوبان المادة التصليبية ، أضف ماء لتعويض الفاقد بالتبخير. ثم إضبط درجة الـ pH عند ٧,٠ وزع البيئة الغذائية فى أنابيب بمعدل ٤ سم٣ لكل منها فى حالة الأجار المائل وبمعدل ٧ سم٣ لكل أنبوبة في حالة الأجار العميق.

بيئة الجيلاتين المغذى **Nutrient gelatin medium**

إضف ١٠٠-١٥٠ جم الجيلاتين إلى ١ لتر من بيئة المرق المغذى

إغلى المخلوط على حمام مائى حتى تمام ذوبان المادة التصليبية ، أضف ماء لتعويض الفاقد بالتبخير.

إضبط درجة الـ pH عند ٧,٠ ثم وزع البيئة الغذائية فى أنابيب بمعدل ٧ سم٣ لكل أنبوبة في حالة الجيلاتين المغذى العميق.

بيئة أجار الجلوكوز **Glucose agar medium**

يضاف إلى لتر من بيئة الأجار المغذي الآتى :

جلوكوز	١٠ جرام.
الـ pH	٧,٢.

بيئة أجار الجلوكوز ومستخلص الخميرة

Yeast extract and glucose agar medium

فوسفات ثنائى الصوديوم	٢ جرام
مستخلص لحم	٣ جرام
مستخلص خميرة	٢ جرام
تربتون	٥ جرام

جلوكوز	١٠ جرام
أجار أجار	١٥ جرام
ماء مقطر	١٠٠٠ سم^٣
الـــpH	٧,٠

بيئة بويون الجلوكوز **Glucose broth medium**

يضاف إلى لتر من بيئة المرق المغذي الآتى

جلوكوز	٥ جرام
الـــpH	٧,٠

بيئة أجار الثيوجليكولات **Thioglycolate agar medium**

ببتون	٢٠ جرام
كلوريد صوديوم	٥ جرام
جلوكوز	١٠ جرام
ثيوجليكولات الصوديوم	٢ جرام
Sod. formaldehyde sulfoxylate	٥ جرام
أزرق ميثيلين	٠,٠٠٢ جرام
أجار أجار	٢٠ جرام
ماء مقطر	١٠٠٠ سم^٣

إغلى المخلوط على حمام مائى حتى تمام ذوبان المادة التصليبية ، أضف ماء لتعويض الفاقد بالتبخير. إضبط درجة الـــpH عند ٧,٤

بيئة أجار النشا **Starch agar medium**

حضر محلول النشا بإذابة ٢ جم نشا فى كمية من الماء الدافئ مع التســـخين المستمر حتى الذوبان إضف محلول النشا إلى ١ لتر من بيئة الأجار المغذى

إغلى المخلوط على حمام مائى حتى تمام ذوبان المادة التصليبية ، أضف ماء لتعويض الفاقد بالتبخير. الـpH ٧,٤

بيئة دوبس **Dubos medium**

نترات صوديوم	٠,٥ جرام
فوسفات ثنائى البوتاسيوم	١,٠ جرام
سلفات ماغنيسيوم	٠,٥ جرام
كلوريد بوتاسيوم	٠,٥ جرام
كبريتات حديديك	أثار
ماء مقطر	١٠٠٠ سم^{3}
الـpH	٧,٥

وزع البيئة الغذائية فى الأنابيب بمعدل ٥ سم^{3} لكل إنبوبة مع وضع شريط من ورق الترشيح كمصدر للسليلوز فى كل إنبوبة بحيث يكون جزء منها مغمور فى البيئة وجزء فوق سطحها ثم عقم الأنابيب.

بيئة أومليانسكى **Omliansky`s medium**

كبريتات أمونيوم أو فوسفات أمونيوم	١,٠ جرام
فوسفات ثنائى البوتاسيوم	١,٠ جرام
سلفات ماغنيسيوم	٠,٥ جرام
كبريتات كالسيوم	٢,٠ جرام
كلوريد صوديوم	أثار
ماء مقطر	١٠٠٠ سم^{3}

وزع البيئة الغذائية المحضرة فى الأنابيب بمعدل ٥ سم^3 لكل إنبوبة مع وضع شريط من ورق الترشيح كمصدر للسليلوز فى كل إنبوبة بحيث يكون مغمور فى البيئة ثم عقم الأنابيب.

بيئة بويون اللاكتوز لاختبار التخمر **Lactose broth medium**

يضاف إلى لتر من بيئة المرق المغذي الآتى

سكر لاكتوز	٥ جرام
دليل البروموثيمول بلو	١ سم^3
الـــpH	٧,٠

وزع البيئة الغذائية المحضرة في أنابيب بمعدل ٧ سم^3 لكل أنبوبـــة ، ضـــع بداخل كل أنبوبة أنبوبة درهام Durham tube مقلوبة لإختبار تكون غاز.

بيئة أجار الإيوسين وأزرق الميثيلين

Eosin methylene blue agar medium :

ببتون	١٠ جرام
فوسفات ثنائى البوتاسيوم	٢,٠ جرام
أجار أجار	٢٠ جرام
ماء مقطر	١٠٠٠سم^3

أخلط المكونات ثم أغلى حتى الذوبان مع إضافة ماء لتعويض الفاقد بالتبخير. لا حاجة لضبط الـــpH . تعبأ فى دوارق بواقع ١٠٠ سم^3 لكل دورق ثم تعقم فى الأوتوكلاف . تسيح عند الإستعمال ثم يضاف لكل دورق :

سكر لاكتوز	١ جرام
محلول الإيوسين المائى ٢٪	٢سم^3
محلول الميثيلين الأزرق المائى ٠,٥ ٪	١,٣ سم^3

إخلط جيداً ثم ضع الدوارق فى جهاز أرنولد لمدة ٥ دقائق ثم برد إلى ٥٠°م وصب فى الأطباق المعقمة.

بيئة مرق التربتون Tryptone broth medium

تربتون	١٠ جرام
مستخلص لحم	٣ جرام
ماء مقطر	١٠٠٠ سم^{٣}
الـــpH	٧,٢

بيئة بويون الجلوكوز Glucose broth medium

يضاف ٥ جرام جلوكوز إلى لتر من بيئة المرق المغذي

بيئة مرق الجلوكوز والفوسفات والببتون

Glucose phosphate peptone broth medium

بروتيوز ببتون	٥ جرام
فوسفات ثنائى البوتاسيوم	٠,٥ جرام
جلوكوز	٥ جرام
ماء مقطر	١٠٠٠ سم^{٣}

بيئة السترات Citrate medium

فوسفات امونيوم وصوديوم	١,٥ جرام
فوسفات ثنائى البوتاسيوم	١,٠ جرام
كبريتات ماغنسيوم	٠,٢ جرام
سترات صوديوم	٣ جرام
ماء مقطر	١٠٠٠ سم^{٣}

بيئة أجار مستخلص التربة **Soil extract agar medium**

أجار أجار	١٥ جرام
جلوكوز	١ جرام
فوسفات ثنائى البوتاسيوم	٠,٥ جرام
مستخلص تربة	١٠٠ سم٣
ماء حنفية	٩٠٠ سم٣
الـــpH	٦,٨ – ٧,٠

يحضر مستخلص التربة بإضافة لتر ماء حنفية إلى كيلو جرام مـــن تربة زراعية خصبة ، ثم تسخن فى الأوتوكلاف لمدة نصف ساعة . يضاف إلى معلق التربة الزراعية كمية صغيرة من كربونات الكالسيوم ، ثم يرشـــح فى مرشح بوخنر بإستعمال ورقتى ترشيح ، ويكرر ذلك حتى تحصل علـــى مترشح رائق . يعبأ المستخلص فى زجاجات ويعقم ويحفظ فى الثلاجة لحين إستعماله.

بيئة مارتن **Martin`s medium**

جلوكوز	١٠,٠ جرام
فوسفات ثنائى البوتاسيوم	١,٠ جرام
كبريتات ماغنسيوم	٠,٥ جرام
ببتون	٥,٠ جرام
روزبنجال	٠,٣٣ جرام
ماء مقطر	١٠٠٠ سم٣
أجار أجار	٢٠,٠ جرام

بيئة السكروز ومستخلص الخميرة السائلة (بيئة وينوجرادسكى المعدلة)

Modified Wingradesk`s medium

فوسفات ثنائى البوتاسيوم	١,٠ جرام
كبريتات ماغنسيوم	٠,٢ جرام
كلوريد صوديوم	٠,٠٢ جرام
كبريتات منجنيز	٠,٠٢ جرام
كبريتات حديدوز	٠,٠٢ جرام
موليبيدات أمونيوم	٠,٠٠١ جرام
كربونات كالسيوم	٢,٠ جرام
سكروز	٢٠,٠ جرام
مستخلص خميرة (١٠٪)	٠,١ سم^{٣}
ثيوجليكولات الصوديوم	١جرام
أجار أجار	١ جرام
ماء مقطر	١٠٠٠ سم^{٣}

بيئة أجار المانيتول ومستخلص الخميرة

Yeast extract manitol agar medium

مانيتول	١٠جرام
فوسفات ثنائى البوتاسيوم	٠,٥ جرام
كبريتات ماغنسيوم	٠,٢ جرام
كلوريد صوديوم	٠,١ جرام
كربونات كالسيوم	٣,٠ جرام
مستخلص خميرة (١٠٪)	١٠٠ سم^{٣}
أجار أجار	١٥ جرام

ماء مقطر	٩٠٠ سم^{٣}

بيئة المانيتول والسكروز Sucrose manitol medium

مانيتول	١٠,٠ جرام
سكروز	٢٠,٠ جرام
كبريتات ماغنسيوم	٠,٢ جرام
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	٥,٠ جرام
كبريتات كالسيوم	٠,١ جرام
كلوريد صوديوم	٠,٢ جرام
كربونات كالسيوم	٥,٠ جرام
كبريتات منجنيز	آثار
حمض موليبديك	آثار
كلوريد حديديك	آثار
ماء مقطر	١٠٠٠ سم^{٣}
الـ pH	٧,٠

بيئة أجار المولت Molt agar medium

مستخلص مولت	٣٠ جرام
أجار أجار	٢٠ جرام
ماء	١٠٠٠ سم^{٣}
الـ pH	٥,٥

ملحق رقم ٢

الصبغات

Stains

صبغة فوكسين مخفف **Diluted fuchsin stain**

فوكسين قاعدى ٠,١ جرام

ماء مقطر ١٠٠ سم^3

يذاب الفوكسين فى الماء

صبغة أزرق ميثيلين **Methylene blue stain**

أزرق ميثيلين ١ جرام

ماء مقطر ١٠٠ سم^3

يوضع أزرق الميثيلين فى هاون ويضاف الماء مع الطحن إلى أن يذوب ثم يرشح المحلول الناتج

صبغة الجنسيان أو الكريستال البنفسجى (تركيب جرام)

Huker`s crystal violet stain

كريستال بنفسجى ٤ جرام

كحول ٩٥٪ ٢٠ سم^3

ماء مقطر ٨٠ سم^3

يذاب كريستال بنفسجى فى الكحول ثم يخلط بالماء

صبغة أخضر الملاكيت (٥٪) **Malakite geen stain (5%)**

أخضر الملاكيت ٥ جرام

ماء ١٠٠ سم^3

تذاب الصبغة فى الماء

صبغة كربول فوكسين مركز **Carbol fuchsin stain**

فوكسين قاعدى	١ جرام
كحول ٩٥٪	١٠ سم٣
فينول	٥ جرام
ماء مقطر	٩٥ سم٣

يذاب الفوكسين فى الكحول ويذاب الفينول فى الماء ثم يخلط المحلولين

صبغة الكريستال البنفسجى (١٪) **Crysail violet stain (1%)**

يذاب ١٠ جرام من صبغة كريستال بنفسجى فى لتر ماء مقطر

ملحق رقم ٣

المحاليل

Solutions

Sodium hydroxide — <u>هيدروكسيد صوديوم تركيز ١ع</u>

هيدروكسيد صوديوم	٤٠ جرام
ماء مقطر	١٠٠٠ سم^{٣}

تحفظ فى زجاجات بسدادة كاوتشوك

<u>محلول السليمانى تركيز ١/١٠٠٠</u>

Mercuric chloride (1/1000) Solution

كلوريد الزئبقيك	١ جرام
HCl	٢,٥ سم^{٣}
ماء مقطر	١٠٠٠ سم^{٣}

يذاب كلوريد الزئبقيك فى الماء ثم يضاف الحامض

Pyrogallic solution (50%) — <u>محلول البيروجالول ٥٠٪</u>

حامض البيروجاليك	٥٠ جرام
ماء مقطر	٥٠ سم^{٣}

يذاب الحامض فى الماء مع التسخين والتقليب ثم يحفظ فى زجاجة محكمة القفل .

Vaspar — <u>الفاسبار</u>

فازلين ١ جزء

زيت بارافين ١ جزء

يعقم المخلوط

محلول اليود (تركيب جرام) Gram`s iodine solution

يود ١ جرام

يودور بوتاسيوم ٢ جرام

ماء مقطر ٣٠٠ سم^3

يطحن اليود مع اليودور فى هاون ثم يذاب المسحوق فى الماء

كحول حامضى Acid alcohol

كحول ٩٥٪ ٩٧سم^3

حمض هيدروكلوريك مركز ٣سم^3

يضاف الحامض إلى الكحول

محلول كبريتات نحاس (٢٠٪) Cupper sulfate solution

يذاب ٢٠٠ جرام كبريتات نحاس فى ماء مقطر ويكمل المحلول إلى لتر

محلول فوق أكسيد الهيدروجين (H_2O_2) Hydrogen peroxide

١ جزء من محلول H_2O_2

٥ أجزاء ماء مقطر

محلول فسيولوجى Isotonic normal saline solution

كلوريد صوديوم ٨,٥ جرام

ماء مقطر ١٠٠٠ سم^3

محلول لاكتوفينول Lactophenol solution

بلورات فينول	٢٠ جرام
حامض لكتيك	٢٠سم^{٣}
جلسرين	٤٠ سم^{٣}
ماء مقطر	٤٠ سم^{٣}

تخلط المكونات وتحفظ فى زجاجات بنية اللون لحين الإستعمال

ملحق رقم ٤

الدلائل

Indicators

دليل البروموثيمول بلو **Bromothymol blue indicator**

دليل البروموثيمول بلو ٠,٤ جرام

كحول ٩٥ ٪ ٥٠٠ سم^{٣}

ماء مقطر ٥٠٠ سم^{٣}

يذاب البروموثيمول بلو فى الكحول ثم يضاف الماء ويرشح

دليل عباد الشمس (٥٪) **Litmus indicator**

دليل عباد الشمس ٥ جرام

ماء مقطر ١٠٠ سم^{٣}

يذاب الدليل بوضعه في جهاز أرنولد لمدة ٢ ساعة مع الرج ثم يرشح ويعقم فى جهاز أرنولد

دليل الأكسجين **Oxygen indicator**

محلول أ : هيدروكسيد صوديوم ٠,١ ع ٦سم^{٣}

ماء مقطر ٩٤ سم^{٣}

محلول ب : محلول مائى من أزرق الميثيلين ٠,٥ ٪ ٣سم^{٣}

ماء مقطر ٩٧ سم^{٣}

محلول ج : جلوكوز ٦٪ مضاف إليه بلورة من الثيمول ١٠٠ سم^{٣}

تمزج المحاليل أ , ب , ج – سخن للغليان إلى أن يزول اللون.

دليل أحمر الميثيل **Methyl red indicator**

دليل أحمر الميثيل ٠,١ جرام

كحول ٩٥٪	٢٥٠ سم^{3}
ماء مقطر	٢٥٠ سم^{3}

أذب أحمر الميثيل فى الكحول ثم أضف الماء ورشح

دليل ألفانفثول **Alphanaphthol indicator**

دليل ألفانفثول	٥ جرام
كحول ٩٥٪	١٠٠ سم^{3}

ملحق رقم ٥

جداول العد التقريبية

1.0	0.1	0.01	M.P.N	1.0	0.1	0.01	M.P.N	1.0	0.1	0.01	M.P.N
0	0	0	-	1	0	0	20	2	0	0	45
0	0	1	18	1	0	1	40	2	0	1	68
0	0	2	36	1	0	2	60	2	0	2	91
0	0	3	54	1	0	3	80	2	0	3	120
0	0	4	72	1	0	4	100	2	0	4	140
0	0	5	90	1	0	5	120	2	0	5	160
0	1	0	18	1	1	0	40	2	1	0	68
0	1	1	36	1	1	1	61	2	1	1	92
0	1	2	55	1	1	2	81	2	1	2	120
0	1	3	73	1	1	3	100	2	1	3	140
0	1	4	91	1	1	4	120	2	1	4	170
0	1	5	110	1	1	5	140	2	1	5	190
0	2	0	37	1	2	0	61	2	2	0	93
0	2	1	55	1	2	1	82	2	2	1	120
0	2	2	74	1	2	2	100	2	2	2	140
0	2	3	92	1	2	3	120	2	2	3	170
0	2	4	110	1	2	4	150	2	2	4	190
0	2	5	130	1	2	5	170	2	2	5	220
0	3	0	56	1	3	0	83	2	3	0	120
0	3	1	74	1	3	1	100	2	3	1	140
0	3	2	93	1	3	2	130	2	3	2	170
0	3	3	110	1	3	3	150	2	3	3	200
0	3	4	130	1	3	4	170	2	3	4	220
0	3	5	150	1	3	5	190	2	3	5	290
0	4	0	75	1	4	0	110	2	4	0	150
0	4	1	94	1	4	1	130	2	4	1	170
0	4	2	110	1	4	2	150	2	4	2	200
0	4	3	130	1	4	3	170	2	4	3	230
0	4	4	150	1	4	4	190	2	4	4	250
0	4	5	170	1	4	5	220	2	4	5	280
0	5	0	94	1	5	0	130	2	5	0	170
0	5	1	110	1	5	1	150	2	5	1	200
0	5	2	130	1	5	2	170	2	5	2	230
0	5	3	150	1	5	3	190	2	5	3	250
0	5	4	170	1	5	4	220	2	5	4	290
0	5	5	190	1	5	5	240	2	5	5	320

جدول العد التقريبي

1.0	0.1	0.01	M.P.N	1.0	0.1	0.01	M.P.N	1.0	0.1	0.01	M.P.N
3	0	0	78	4	0	0	130	5	0	0	230
3	0	1	110	4	0	1	170	5	0	1	310
3	0	2	130	4	0	2	210	5	0	2	430
3	0	3	160	4	0	3	250	5	0	3	580
3	0	4	200	4	0	4	300	5	0	4	780
3	0	5	230	4	0	5	360	5	0	5	950
3	1	0	110	4	1	0	170	5	1	0	330
3	1	1	140	4	1	1	210	5	1	1	450
3	1	2	170	4	1	2	260	5	1	2	540
3	1	3	200	4	1	3	310	5	1	3	840
3	1	4	230	4	1	4	360	5	1	4	1100
3	1	5	270	4	1	5	420	5	1	5	1200
3	2	0	140	4	2	0	220	5	2	0	400
3	2	1	170	4	2	1	260	5	2	1	700
3	2	2	200	4	2	2	320	5	2	2	850
3	2	3	240	4	2	3	380	5	2	3	1200
3	2	4	270	4	2	4	440	5	2	4	1300
3	2	5	310	4	2	5	500	5	2	5	1800
3	3	0	170	4	3	0	270	5	3	0	790
3	3	1	210	4	3	1	330	5	3	1	1100
3	3	2	240	4	3	2	390	5	3	2	1400
3	3	3	280	4	3	3	450	5	3	3	1500
3	3	4	310	4	3	4	520	5	3	4	2100
3	3	5	350	4	3	5	590	5	3	5	2500
3	4	0	210	4	4	0	340	5	4	0	1300
3	4	1	240	4	4	1	400	5	4	1	1700
3	4	2	280	4	4	2	470	5	4	2	2200
3	4	3	320	4	4	3	540	5	4	3	2800
3	4	4	360	4	4	4	620	5	4	4	3500
3	4	5	400	4	4	5	690	5	4	5	4300
3	5	0	250	4	5	0	410	5	5	0	2400
3	5	1	290	4	5	1	480	5	5	1	3500
3	5	2	320	4	5	2	560	5	5	2	5400
3	5	3	370	4	5	3	640	5	5	3	9200
3	5	4	410	4	5	4	720	5	5	4	16000
3	5	5	450	4	5	5	810	5	5	5	

جدول العد التقريبي (الأراضي والمواد الغذائية الصلبة)

P1	P2	Most probable number for indicated values of P3					
		0	1	2	3	4	5
0	0	-	0.018	0.036	0.054	0.072	0.09
0	1	0.018	0.036	0.055	0.073	0.091	0.11
0	2	0.038	0.055	0.074	0.092	0.11	0.13
0	3	0.056	0.074	0.093	0.11	0.13	0.15
0	4	0.075	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17
0	5	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19
1	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12
1	1	0.04	0.061	0.081	0.1	0.12	0.14
1	2	0.061	0.082	0.1	0.12	0.15	0.17
1	3	0.083	0.1	0.13	0.15	0.17	0.19
1	4	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22
1	5	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22	0.24
2	0	0.045	0.068	0.091	0.12	0.14	0.16
2	1	0.068	0.092	0.12	0.14	0.17	0.19
2	2	0.093	0.12	0.14	0.17	0.19	0.22
2	3	0.12	0.14	0.17	0.2	0.22	0.25
2	4	0.15	0.17	0.2	0.23	0.25	0.28
2	5	0.17	0.2	0.23	0.26	0.29	0.32
3	0	0.078	0.11	0.13	0.16	0.2	0.23
3	1	0.11	0.16	0.17	0.2	0.23	0.27
3	2	0.14	0.17	0.2	0.24	0.27	0.31
3	3	0.17	0.21	0.24	0.28	0.31	0.35
3	4	0.21	0.24	0.28	0.32	0.36	0.4
3	5	0.25	0.29	0.32	0.37	0.41	0.45
4	0	0.13	0.17	0.21	0.25	0.3	0.36
4	1	0.17	0.21	0.26	0.31	0.36	0.42
4	2	0.22	0.26	0.32	0.38	0.44	0.5
4	3	0.27	0.33	0.39	0.45	0.52	0.59
4	4	0.34	0.4	0.47	0.54	0.62	0.69
4	5	0.41	0.48	0.56	0.64	0.72	0.81
5	0	0.23	0.31	0.43	0.54	0.76	0.95
5	1	0.33	0.46	0.64	0.84	1.1	1.3
5	2	0.49	0.7	0.95	1.2	1.5	1.8
5	3	0.79	1.1	1.4	1.8	2.1	2.5
5	4	1.3	1.7	2.2	2.8	3.5	4.3
5	5	2.4	3.5	5.4	9.2	16	-

المراجع

References

١- أمين عبد الجبار السلمي وزهرة مراد علي (١٩٨٧) . تجارب مختارة في الأحياء المجهرية - وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة البصرة – العراق .

٢- الشحات محمد رمضان وراوية فتحي جمال (٢٠٠٥) . ميكروبيولوجيا التخمرات - دار الفكر العربي – القاهرة .

٣- جابر زايد بريشة وعادل محمود حماد وعبد الوهاب عبد الحافظ (٢٠٠١) . أساسيات الميكروبات الصناعية – الدار العربية للنشر والتوزيع – القاهرة – مصر .

٤- جون سميث (١٩٨٧) . ترجمة عبد العزيز حامد أبو زنادة – عمادة شئون المكتبات – جامعة الملك سعود – ص ب ٢٢٤٨٠ – الرياض ١١٤٩٥ – المملكة العربية السعودية .

٥- حسين عبد الله محمد الفضالي (٢٠٠٧) . التدريبات العملية في ميكروبيولوجيا الأغذية – الطبعة الأولى - مكتبة نانسي - دمياط الجديدة – مصر .

٦- حسين عبد الله محمد الفضالي (٢٠٠٧) . الميكروبيولوجيا العامة – الطبعة الأولى - مكتبة نانسي - دمياط الجديدة – مصر .

٧- حسين عبد الله محمد الفضالي (٢٠٠٧) . ميكروبيولوجيا الأغذية – الطبعة الأولى - مكتبة نانسي - دمياط الجديدة – مصر .

٨- دين أ. أندلسون (١٩٩٢) . التدريبات المعملية في علم الكائنات الحية الدقيقة – ترجمة محمد أحمد حداد عبد القادر وعبد الرؤوف المالح وجاد الله عبد الله الحسن وسالم عمر الفيرجاني – جامعة عمر المختار – البيضاء – ليبيا.

٩- سعد شحاتة محمد المراغي (١٩٩٤) . مقدمة في علم الفطريات – الطبعة الأولى – منشورات جامعة عمر المختار . ص ب ٩١٩ – البيضاء - ليبيا .

١٠- سعد على زكى محمود (١٩٨٨) . الميكروبيولوجيا التطبيقية العملية – مكتبة الأنجلو المصرية – شارع محمد فريد – القاهرة – مصر .

١١- عبد الوهاب محمد عبد الحافظ ومحمد الصاوى مبارك (١٩٩٦) . ميكربيولوجيا التطبيقية – المكتبة الكاديمية – القاهرة .

١٢- محمد على أحمد ومحمد عبد الرازق النواوى (١٩٩٩) . الفطريات الصناعية – الدار العربية للنشر والتوزيع – القاهرة – مصر .

١٣- مصطفى كمال أبو الدهب ومحمد عبد القادر الجعرانى (١٩٨٤) . البكتيريا - الجزء الثانى - التمارين المعملية الأساسية - الطبعة الثانية – دار المعارف – الإسكندرية – مصر .

١٤- نزار فؤاد جاد الله وعقاب العزام وعبد المجيد الشاعر وعرفات المنسى (١٩٩٤) . الأحياء الدقيقة العملية – دار المستقبل للنشر والتوزيع – عمان – الأردن .

١٥- هارى و. سيلى (الابن) وبول ج . فان ديمارك (١٩٨٩) . الكائنات الدقيقة عملياً . الطبعة الأولى – ترجمة عبد الوهاب محمد عبد الحافظ ومحمد الصاوى مبارك . الدار العربية للنشر والتوزيع – ١٧ ش نادى الصيد بالدقى – القاهرة – مصر .

http://media.pearsoncmg.com/bc/bc_tortora_microbiolo_7/micro_place_media/supplement/antibiosi/

http://biology.uwsp.edu/faciltv/TBarta/hydrolysis.htm

http://www.medicalliterature.bravepages.com/diff%20media.htm

http://austin.cc.tx.us/microbugz/38nutgel.html

http://medic.med.uth.tmc.edu/path/oxidase.htm

رقم الإيداع بدار الكتب المصرية بالقاهرة
٢٠٠٨/١٥٦٦٣
الترقيم الدولى للكتاب
ISBN 977 – 6186 – 80 – 7





212
AlAqsa